

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DU RÔLE DES RÉCEPTEURS DE TYPE II DES BONE
MORPHOGENETIC PROTEINS DANS LA MÉDIATION DES EFFETS
CELLULAIRE ET MOLECULAIRES DE LA BMP9 CHEZ LES CELLULES
ENDOTHÉLIALES.

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
Ali BELAYACHI
AOÛT 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENT

En premier lieu je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Bruno LARRIVÉE. Merci Bruno de m'avoir accueilli dans ton laboratoire, de m'avoir proposé un sujet très intéressant et m'avoir laissé la liberté de l'orienter au cours du déroulement de ma maîtrise. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à tes qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ma maîtrise.

Un grand merci à mon co-directeur Dr. François DRAGON, sans lui je n'aurais jamais pu m'inscrire à l'UQÀM.

Ma considération et mon respect sont adressés aux membres de mon jury pour le temps qu'ils consacrent pour la correction de mon travail surtout en cette période de vacances.

Mes remerciements vont aussi aux membres de notre équipe.

Je voudrais aussi remercier Dre El Sylvie LESAGE pour ses conseils.

J'en profite aussi pour remercier Dr. Khalil MILOUDI et COLLIN Roxane de m'avoir aidé à apprendre certaines techniques pour l'avancement du projet.

Enfin, je souhaite dédier ce mémoire à tous les membres de ma famille. Je voudrais tout particulièrement exprimer ma reconnaissance à mes parents, mes deux sœurs et ma chérie. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	V
LISTE DES ABRÉVIATION	VI
RÉSUMÉ	VII
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 L'organisation du réseau vasculaire	1
1.2 1.2 Développement des vaisseaux sanguins	3
1.2.1 Vasculogenèse	3
1.2.2 Angiogenèse	3
1.3 Anomalies vasculaires	10
1.4 Thérapies anti-angiogéniques	12
1.5 Les principaux facteurs impliqués dans l'angiogenèses	12
1.5.1 La famille des VEGF	12
1.5.2 La famille des BMP	15
1.5.2.1 Bref histoire	15
1.5.2.2 La structure des BMP	16
1.5.2.3 Les membres de la famille des BMP	16
1.5.2.4 Mécanisme d'action des BMP	16
1.6 BMP9-BMP10-ALK1; nouvelle cible thérapeutique en angiogenèse	26
1.6.1 ALK1	27
1.6.1.1 Rôle de ALK1 dans le développement	27
Chez l'humain	27
In vitro	28
In vivo	28
1.6.1.2 Signalisation de ALK1	29

1.6.1.3 Expression des gènes suite à l'activation de la voie ALK1	29
1.6.1.4 Les récepteurs de type II impliqués dans la voie des BMP	30
ActRIIA et ActRIIB	31
BMPRII	32
1.6.2 BMP9	
1.6.2.1 Généralités	32
1.6.2.2 Effets du BMP9	33
Invitro	33
In vivo	33
1.6.3 BMP10	34
1.6.4 Complexe des récepteurs en présence de BMP9/BMP10	34
1.7 HYPOTHESE DE TRAVAIL	37
CHAPITRE II	
ARTICLE: Modulation of BMP9/ALK1 signaling in endothelial cells by type II	
BMP receptors.	39
Résumé de article	40
2.1 Summary	41
2.2 Introduction	42
2.3 Experimental Procedures	44
2.4 Results	48
2.5 Discussion	52
2.6 Acknowledgments	55
2.7 References	56
2.8 Figure Legends	58
CHAPITRE III	
DISCUSSION	70
ANNEXES	
Figures supplémentaires	76
RÉFÉRENCES	78

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure

1.1 Anatomie des vaisseaux sanguins.	2
1.2 L'angiogenèse par bourgeonnement.	5
1.3 Schéma démontrant l'effet de Notch/Dll4 sur les tips/Stalk cells.	7
1.4 Schéma démontrant que la voie ALK1-BMP9 contribue dans la Signalisation de la voie Notch.	9
1.5 Différence entre une vascularisation normale et pathologique (tumorale).	11
1.6 Schéma démontrant la liaison des VEGF à leurs récepteurs.	14
1.7 Mécanisme d'action des BMP.	17
1.8 Schéma démontrant la liaison des BMP à leurs récepteurs.	22
1.9 Schéma démontrant le mode d'internalisation des récepteurs aux BMP.	24
1.10 Schéma démontrant la forte affinité entre ALK1-BMP9 et les récepteurs de type II.	35
2.1 Expression of type II receptors in ECs.	
2.2 Contribution of type II BMP receptors to endothelial sprouting <i>in vitro</i>	
2.3 BMP9 inhibits endothelial proliferation and migration in the presence of BMPRII.	
2.4 BMP9 signaling requires BMPRII to modulate endothelial gene expression.	
2.5 Requirement of type II BMP receptors for BMP9 signaling in HUVECs.	
2.6 BMPRII regulates ALK1 internalization in following BMP9 stimulation.	
2.7 Working model for BMP9/ALK1/BMPRII signaling in ECs.	
3.1 Le double effet du BMP9 sur différents types de CE.	

3.2 qPCR comparative entre l'expression des récepteurs de type II aux BMP chez les HUVEC et les cellules lymphatiques.

Tableaux

1.1 Caractéristiques physiques des vaisseaux sanguins.	2
1.2 Effet de l'absence des BMP chez la souris et l'humain.	21

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYME

ActRII: Activine Receptor type II.
ALK: Activine receptor-like kinase.
AMHRII: AMH Receptor type II.
ANG2: Angiopoietin.
BAEC: Bovine Aortic Endothelial Cells.
BMP: Bone Morphogenetic Protein.
BMPER: BMP binding Endothelial cell precursor-derived Regulator.
BMPRII: BMP Receptor type II.
ca: constitutivement actif.
CE:cellules endothéliales.
Dll4: Delta Like 4.
DMLA: Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age.
ENG: Endogline .
FGF:Fibroblast Growth Factor .
FLK1: Fetal Liver Kinase.
FLT1: FMS-Like-Tyrosine kinase.
GDF: Growth and Differentiation Factor.
HMEC: Human Microvacular Endothelial Cell.
HMVECd: Human MicroVascular Endothelial Cell from the dermis.
HMVECl: Human MicroVascular Endothelial Cell from lungs.
HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire.
ID: Inhibitor of differentiation.
KDR: Kinase Domain Receptor.
MAV: Malformations Artério-Veineuses.
MEC: Matrice Extracellulaire.

MEEC: Mouse Embryonic Endothelial Cells.

MGP: Matrix Gla Protein.

MH: Mad Homology.

MIS: Substance Inhibitrice de l'hormone Muellérienne.

MMP: Matrix métalloprotéases.

NRP: Neuropiline.

PI: Phosphoinositol.

PKC: Kinase/Akt et protein Kinase C.

SNA: Système Nerveux Autonome.

TGF- β : Transforming Growth Factor β .

TGF- β RII : TGF- β Receptor type II.

TSR: - β Super famille Receptor.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

VPF: Vascular Permeability Factor.

RÉSUMÉ

Activine receptor-like kinase-1 (ALK1) est un récepteur des *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) de type-I spécifique des cellules endothéliales. Il joue un rôle crucial dans le développement des vaisseaux sanguins en se liant au ligand circulant *Bone Morphogenetic Protein 9* (BMP9) et ses effets se traduisent par le remodelage et la maturation des vaisseaux sanguins. Il a été démontré que l'activation de ALK1 entraîne la quiescence des cellules endothéliales vasculaires. Cependant dans certains cas, ALK1 peut également induire la prolifération et la migration des vaisseaux sanguins. Les mécanismes sous-jacents à cette double activité demeurent néanmoins inconnus.

Suite à la liaison récepteur-ligand, la signalisation de ALK1 entraîne la formation de complexes avec différents BMP-récepteurs de type-II : *Activin Receptor II-A* (ActRIIA), *Activin Receptor II-B* (ActRIIB) et *BMP receptor II* (BMPRII). L'implication de ces trois récepteurs de type-II sur la signalisation de ALK1 n'a été que très peu reportée dans la littérature. Notre hypothèse soutient que les récepteurs de type II peuvent moduler la signalisation du complexe ALK1/BMP9 et influencer le développement des vaisseaux sanguins. Les travaux réalisés ont eu pour but d'évaluer les implications fonctionnelles des récepteurs de type II dans la signalisation de ALK1 dans les cellules endothéliales et leurs répercussions sur l'angiogenèse. Dans un premier temps, nous avons étudié les voies de signalisations induites par la BMP9 dans des cellules endothéliales en présence ou en absence des récepteurs de type II. Par la suite, nous avons évalué la contribution des récepteurs de type II sur le bourgeonnement, la migration et la prolifération des cellules endothéliales en réponse à la BMP9. Mécanistiquement, nous démontrons que le récepteur BMPRII est nécessaire à l'internalisation de ALK1 en réponse au BMP9, et que ce récepteur est requis pour la transmission des effets anti-angiogéniques de la BMP9. En conclusion, cette étude a améliorée la compréhension du rôle des récepteurs de type II aux BMP dans les processus angiogéniques.

Mots clés : BMP9- ActRIIA- ActRIIB- BMPRII .

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 L'organisation du réseau vasculaire

Le sang circule dans l'organisme à travers un réseau de vaisseaux sanguins. Chaque vaisseau mature est composé de plusieurs couches (Figure-1.1):

1-l'intima : la couche interne qui tapisse la lumière des vaisseaux, formée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) appelée l'endothélium ou tunique interne.

2-La média : appelée aussi tunique moyenne, composée d'un ou deux anneaux de cellules musculaires lisses qui entourent l'intima dans le cas d'artères ou de veines; ou par des péricytes dans le cas des capillaires, ainsi que de fibres réticulaires et d'élastine. Les cellules musculaires sont contrôlées par les neurofibres vasomotrices du SNA (Système Nerveux Autonome) sympathique, et provoquent selon le besoin de l'organisme, soit une vasoconstriction ou une vasodilatation, participant ainsi à la régulation de la circulation sanguine.

3-L'adventice : couche externe, constituée par un tissu conjonctif formé de fibres de collagène. Cette couche contribue à la stabilisation des vaisseaux et à l'attachement des nouveaux vaisseaux aux structures environnantes.

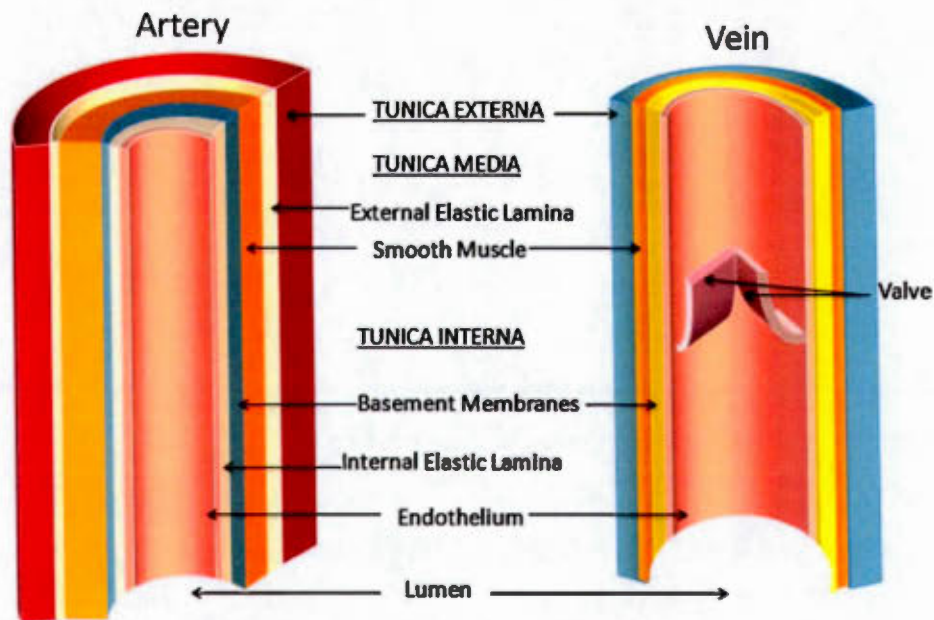


Figure 1.1 : Anatomie des vaisseaux sanguins.

Droite : différentes couches d'une artère

Gauche : différentes couches d'une veine

(Venkatraman, 2008)

Les vaisseaux qui conduisent le sang du cœur vers les tissus sont appelés artères alors que ceux qui le ramène des tissus vers le cœur sont définis comme veines. Les artères se ramifient en vaisseaux de plus en plus petits pour donner naissance aux artérioles, alors que les veines donnent naissance aux veinules. Les capillaires sanguins relient ainsi les artérioles aux veinules, permettant les échanges entre le sang et les liquides interstitiels (Tableau-1.1).

	Artère	Veine
La lumière	Petite	Plus Grande
Tunique moyenne	Plus de muscles lisses Plus de tissu élastique	Moins de muscles lisses Moins d'élastine
Tunique externe	Epaisse	Plus épaisse et robuste

Tableau 1.1 : Caractéristiques physiques des vaisseaux sanguins

La différenciation des artères et des veines se déroule durant la phase embryonnaire du développement. Des signaux génétiques et biomécaniques vont induire une expression différentielle de plusieurs marqueurs endothéliaux entre les artères et les veines. En effet, des études ont démontré que les CE des artères de l'embryon de poulet expriment NRP1 (Neuropiline 1), alors que les veines expriment Np2 (Herzog et al., 2005). La NRP est considérée comme un corécepteur au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). De multiples autres gènes sont aussi impliqués dans la différenciation des artères et des veines, tels que le récepteur EphB4, exclusif aux veines, et son ligand EphrinB2, exprimé principalement dans les artères (Gerety et al., 1999).

1.2 Développement des vaisseaux sanguins

1.2.1 Vasculogenèse

Les premiers vaisseaux chez l'embryon sont formés à partir du mésoderme. Les cellules du mésoderme forment des ilots sanguins après migration vers le sac vitellin et produisent des hémangioblastes pouvant se différencier en cellules endothéliales (cellules périphériques) et en cellules hématopoïétiques

(cellules du centre). Les CE primitives s'associent entre elles pour former un plexus vasculaire primitif (Risau and Flamme, 1995). La vasculogénèse est guidée par plusieurs facteurs dont le VEGF, le *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2) et le *Transforming Growth Factor $\beta 1$* (TGF- $\beta 1$) (Pardanaud and Dieterlen-Lièvre, 1999).

1.2.2 Angiogenèse

Suivant la formation initiale d'un plexus vasculaire primitif par vasculogénèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est assurée par le phénomène de l'angiogenèse. On distingue deux mécanismes d'angiogenèse :

A/ Angiogenèse par intussusception : Caractérisée par la division longitudinale d'un vaisseau sanguin préexistant en deux vaisseaux. Cette angiogenèse est très importante dans le remodelage vasculaire pulmonaire, ainsi que dans la vascularisation des muscles. Une étude a démontré que l'angiogenèse par intussusception est aussi présente lors de la vascularisation tumorale, même si elle est moins prédominante que l'angiogenèse par bourgeonnement (Makanya et al., 2009).

B/ Angiogenèse par bourgeonnement : Caractérisée par l'activation des cellules endothéliales suite à une stimulation par le VEGF pour former des nouveaux vaisseaux. Le terme angiogenèse est utilisé plus souvent pour faire référence à l'angiogenèse par bourgeonnement. Ce type d'angiogenèse se déroule en deux phases principales :

1.2.2.1 Phase d'activation

Elle commence dès la réponse des CE aux VEGF, qui engendre la spécification des CE en *Tip* (cellule du bout) et *Stalk* (cellule du tronc) cells (Figure-1.2).

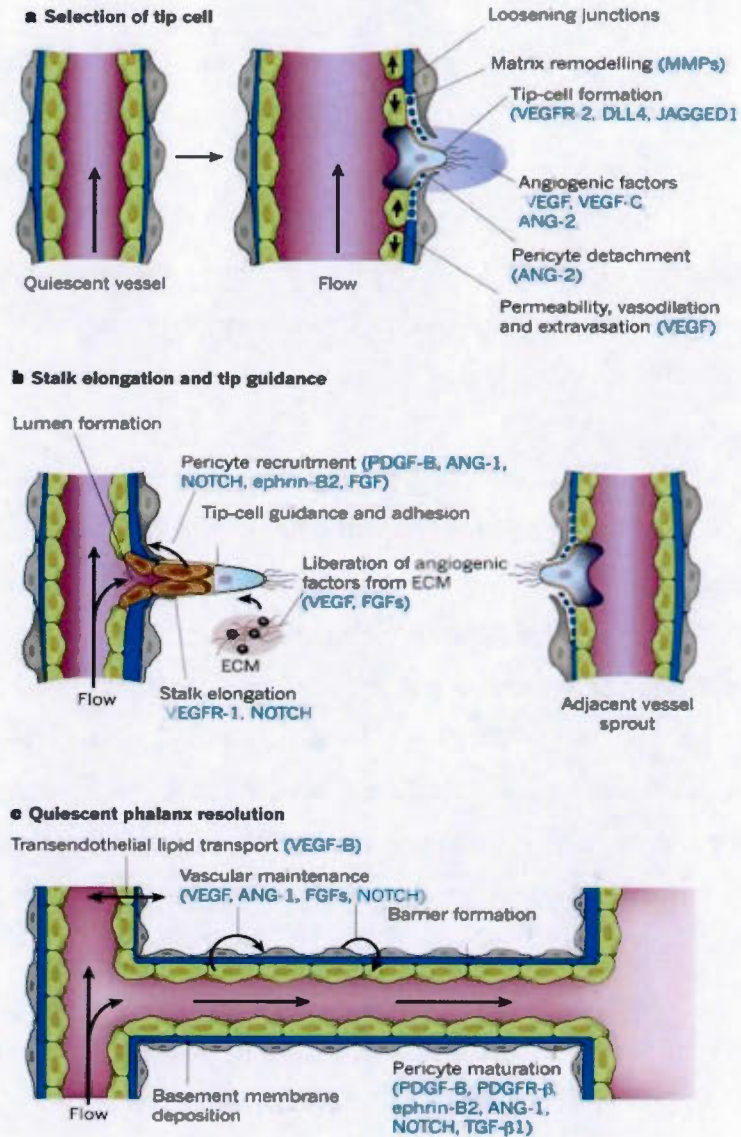


Figure 1.2 : L'angiogenèse par bourgeonnement.

- formation de la *tip cell*.
- Migration de la *tip cell* et prolifération des *salk cells*.
- Formation et maturation du nouveau vaisseau sanguin.

D'après (Carmeliet and Jain, 2011).

Tip et Stalk cells

Lors de l'angiogenèse par bourgeonnement, le VEGF secrété par les tissus hypoxiques active les cellules endothéliales. Les CE activées par le VEGF deviennent très migratoires et vont pousser en direction de la source du gradient de VEGF. Ce type de CE a été dénommé la "*tip cell*". Les CE positionnées derrière les *tip cells*, vont suivre ces CE spécialisées, vont proliférer et vont former des tubes pouvant être perfusés par le sang. Ces CE ont été dénommées les "*stalk cells*" (Gerhardt et al., 2003) (Figure-1.3) .

La spécification de la *tip cell* se produit suite à l'activation du VEGFR2 par le VEGF dans les CE. Cette signalisation va conduire à l'expression de plusieurs protéines importantes pour la spécification *tip cell/stalk cell* et pour les activités migratoires de la *tip cell*, dont l'Apelin, uPar et ESM-1 (del Toro et al., 2010a). Un des gènes importants exprimé par la *tip cell*, suite à une stimulation par le VEGF, est le ligand de la voie Notch : *Delta Like 4* (Dll4). L'expression de Dll4 par la *tip cell* mène à l'activation de la voie Notch dans les *stalk cells* avoisinantes (Figure-1.3) (Hellström et al., 2007). Cette activation de Notch dans les *stalk cells* va entraîner la modulation de l'expression de plusieurs gènes modulant la réponse des CE au VEGF, dont une réduction de l'expression de VEGFR2 et une augmentation du récepteur VEGFR1 (Harrington et al., 2008), limitant ainsi le potentiel migratoire des *stalk cells*. Enfin, les *stalk cells* vont aussi exprimer Jagged-1, un ligand antagoniste de Notch qui va limiter l'activation de cette voie dans les *tip cells* avoisinantes (Benedito et al., 2009). Finalement, les CE matures vont reconstituer leur membrane basale, cesser de proliférer et recruter des péricytes. Ces cellules ont été dénommées les "*phalanx cells*", dû à leur jonctions serrées et matures, rappelant la formation militaire grecque (Mazzone et al., 2009).

Plusieurs gènes sont particulièrement importants pour la spécification *tip/stalk cell* comme HEY1, HEY2, Apelin, Unc5B, JAG1. Leur rôle est développé ultérieurement dans la section « Expression de gènes ».

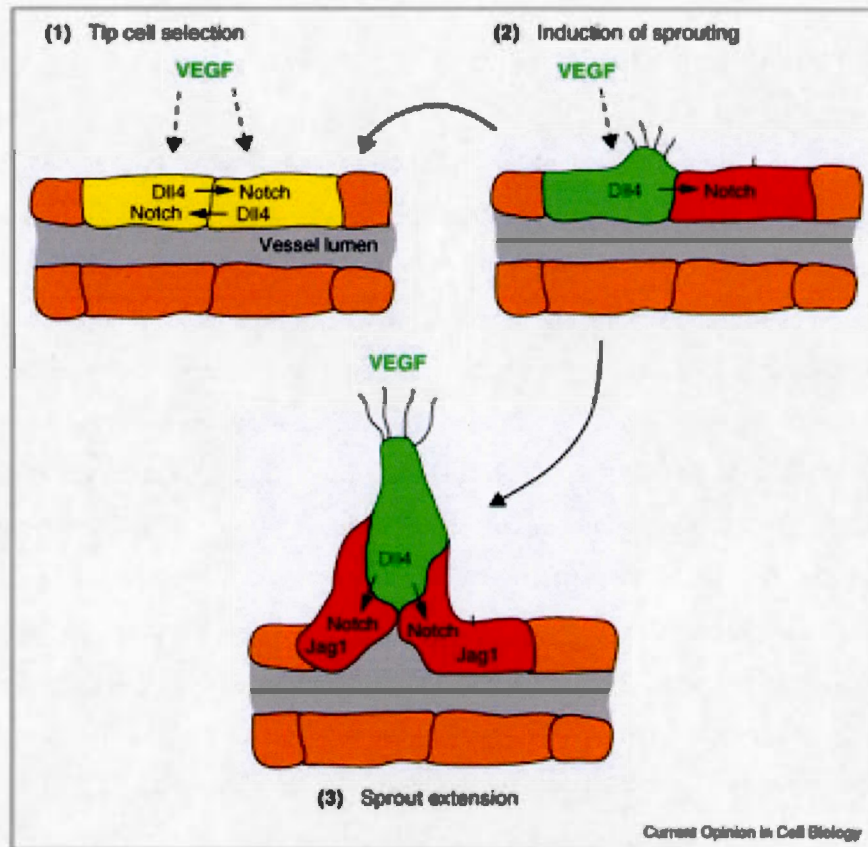


Figure 1.3 : Schéma démontrant l'effet de Notch/Dll4 sur les *tips/Stalk cells* .

- (1) stimulation du bourgeonnement par VEGF.
 - (2) Activation de la voie Dll4 dans une *tip cell* et commencement du bourgeonnement.
 - (3) Activation de la voie Notch et prolifération des *stalk cells* .
- (Eilken and Adams, 2010).

La phase d'activation de l'angiogenèse est aussi caractérisée par la dégradation de la membrane basale permettant ainsi la prolifération et la migration des CE. Cette étape est également appelée : phase de dégradation de la membrane basale.

Phase de dégradation de la membrane basale :

Les CE bordent la couche interne des vaisseaux sanguins. Elles partagent avec les cellules murales une membrane basale constituée de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (Eble and Niland, 2009). La membrane basale ainsi que les cellules murales stabilisent le réseau de CE. Suite à la stimulation au VEGF, les CE secrètent le monoxyde d'azote qui conduit à une vasodilatation des vaisseaux. Cette vasodilatation conduit à l'activation des matrix métalloprotéases (MMP) qui dégradent la MEC et au détachement des cellules murales par l'angiopoietine-2 (ANG2). La membrane basale est dégradée par les MMP (enzyme) comme les MTMMP1 qui sont exprimées chez les *tip cells*. De plus, les MMP libèrent des facteurs de croissance pro-angiogéniques qui sont séquestrés dans la MEC (Arroyo and Iruela-Arispe, 2010). Ils génèrent également des molécules anti-angiogéniques par clivage de protéines du plasma, comme l'endorepelline, l'endostatine, le fubile (*fibulins*) et le constantine, ces molécules aidant à contrôler la germination (Nyberg et al., 2005). Le détachement des cellules murales est stimulé par l'activation du récepteur Tie-2 par son ligand ANG2 (Augustin et al., 2009). Par conséquent, ces étapes ont pour résultat la déstabilisation de l'endothélium, facilitant ainsi la migration des *tip cells*.

1.2.2.2 Phase de maturation

La perfusion du sang dans les vaisseaux sanguins nouvellement formés mène à l'augmentation des niveaux d'oxygène tissulaires, induisant ainsi une

diminution de l'hypoxie et une baisse de l'expression du VEGF, diminuant ainsi les processus angiogéniques (Darland and D'Amore, 1999).

La maturation des vaisseaux sanguins est caractérisée par l'arrêt de la prolifération des CE, la resynthèse d'une membrane basale et le recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses (Folkman and D'Amore, 1996). Les péricytes recouvrent principalement les artérioles et les capillaires et contribuent à la stabilisation des vaisseaux sanguins (Figure-1.2).

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la maturation des vaisseaux. Entre autres, les forces mécaniques du sang (friction, flux laminaire) agissant sur les cellules endothéliales sont critiques pour la quiescence endothéliale et le recrutement péricytaire (Corti et al., 2011). De plus, plusieurs facteurs moléculaires, dont les éphrines, Notch, Wnt et TGF-beta jouent un rôle dans la quiescence vasculaire (Harrington et al., 2008)

Une voie de signalisation particulièrement importante pour la maturation vasculaire est celle engendrée par le récepteur *activin like kinase receptor-1* (ALK1). Suite à l'activation par ses ligands, les *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)-9 et -10, ce récepteur va induire une signalisation menant à la quiescence vasculaire, la différenciation artério-veineuse et le recrutement de cellules périvasculaires (David et al., 2007; Larrivée et al., 2012). Le rôle de ce récepteur dans la formation vasculaire sera détaillé par la suite (Figure-1.4).

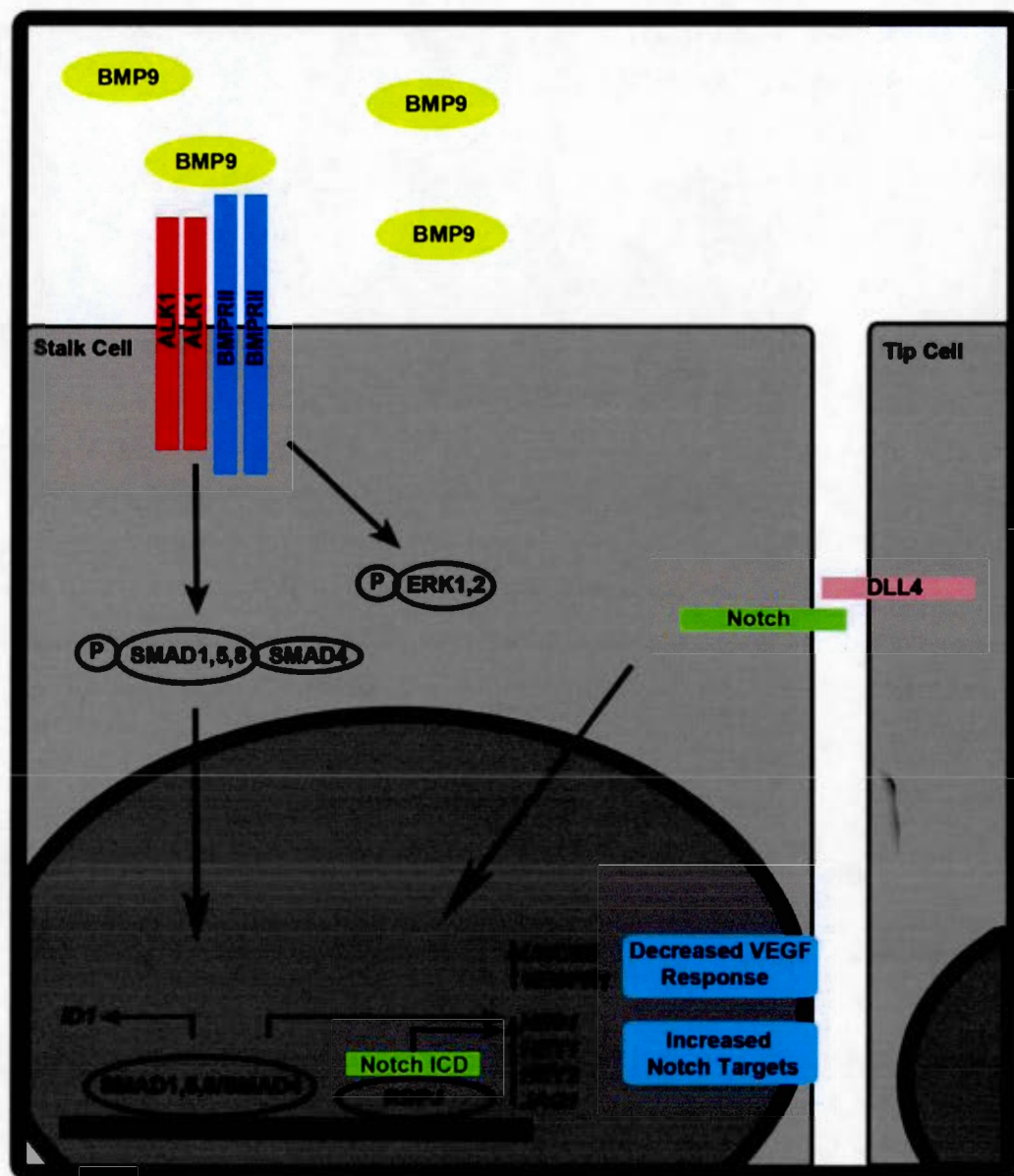


Figure 1.4 : Schéma démontrant que la voie ALK1-BMP9 contribue dans la signalisation de la voie Notch. Page 6-9
(Larrivée et al., 2012).

1.3 Anomalies vasculaires

Chez l'humain sain, les mécanismes pro-angiogéniques et anti-angiogéniques sont en équilibre ou en homéostasie. Plusieurs agents provoquant l'angiogenèse sont essentiels à la formation des nouveaux vaisseaux sanguins, tandis que les inhibiteurs de ce processus sont nécessaires pour éviter une hyper-vascularisation. Le maintien de cette harmonie est indispensable pour prévenir une croissance excessive des vaisseaux sanguins dans des conditions d'angiogenèse physiologique (comme dans le déroulement de la cicatrisation ou durant le cycle reproducteur féminin). Malheureusement, cet équilibre n'est pas conservé dans plusieurs pathologies, tel que le cancer ou plusieurs maladies oculaires et vasculaires, conduisant à une angiogenèse excessive.

Angiogenèse tumorale : Les cellules tumorales ont besoin d'oxygène et de nutriments, ce qui les contraint à mettre en place un réseau vasculaire. Le VEGF, sécrété par les cellules tumorales qui sont fortement hypoxiques (Senger et al., 1986; Wang et al., 1995), va mener à l'activation des cellules endothéliales des tissus avoisinants, qui vont former de nouveaux vaisseaux et envahir la tumeur. Le réseau vasculaire tumoral suit les mêmes mécanismes de mise en place que l'angiogenèse physiologique (Holash et al., 1999). L'analyse de la vascularisation montre cependant certaines différences structurales entre la vascularisation physiologique et la vascularisation tumorale (Figure-1.55). Les vaisseaux tumoraux sont plus dilatés et plus perméabilisés, montrant aussi un défaut structural dans les espaces transcellulaires et la membrane basale (Figure-1.5) (Carmeliet et al., 1996). Peu de péricytes recouvrent aussi les vaisseaux tumoraux (Benjamin et al., 1999).

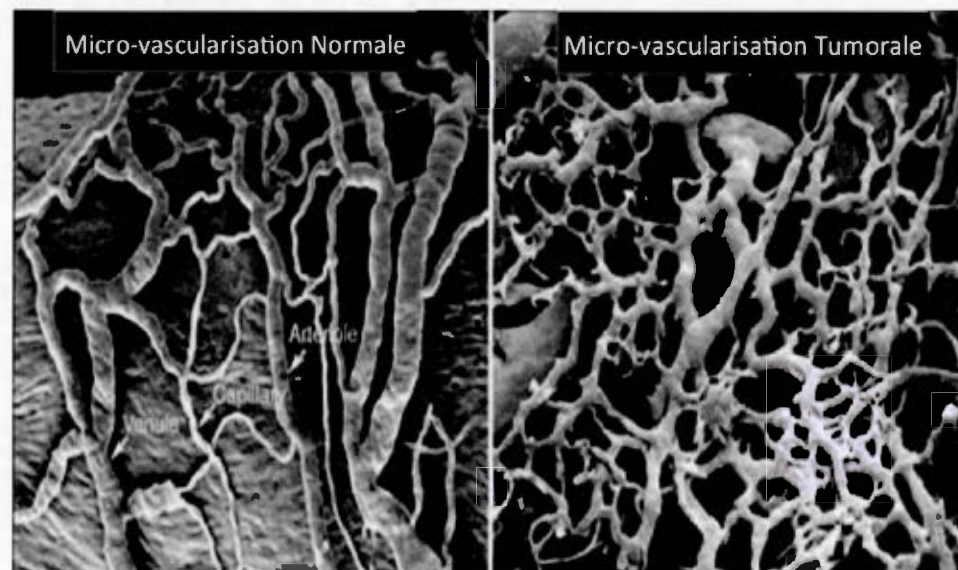


Figure 1.5 : (légende adaptée en Français) Différence entre une vascularisation normale et pathologique (tumorale)

Droite : micro-vascularisation normale : une organisation normale des vaisseaux sanguin dans un tissu.

Gauche : micro-vascularisation tumorale : les vaisseaux sanguins sont plus nombreux avec une organisation anormale.

(McDonald and Baluk, 2005).

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) de type humide: La DMLA, une cause prévalente de cécité chez les gens âgés de plus de 60 ans, est caractérisée par une croissance anormale de nouveaux vaisseaux sous la rétine. Ces vaisseaux fragiles favorisent les fuites vasculaires, qui peuvent provoquer le soulèvement de la rétine, et résultent en l'apparition d'hémorragies rétinienne. Cette condition progresse rapidement si elle n'est pas prise en charge, avec une perte de

vision centrale (la vision périphérique est conservée). Ce développement peut être retardé sous l'effet de molécules bloquant l'action du facteur angiogénique VEGF.

Rétinopathie Diabétique (RD) : un syndrome qui cause des dommages aux capillaires de la rétine chez les patients atteints de diabète. Elle est caractérisée par une augmentation du nombre des vaisseaux sanguins, et la formation d'un œdème rétinien suite à une hyperperméabilité capillaire causée par une hyperglycémie chronique. Elle peut se manifester par des occlusions des capillaires rétiens qui provoquent une ischémie rétinienne. Ces ischémies peuvent favoriser une néo-vascularisation très fragile. Comme pour la DMLA, certains patients sont aussi traités par les anti-VEGF.

D'autres maladies vasculaires comme la télangiectasie hémorragique héréditaire et l'hypertension artérielle pulmonaire sont détaillées dans d'autres sections.

1.4 Thérapies anti-angiogéniques

Depuis 2006, plusieurs composés anti-VEGF comme le ranibizumab ou le pegaptanib sont devenus le traitement de choix pour traiter les patients atteints de DMLA de type humide. Ces anti-VEGF ont en effet remplacé les anciennes techniques destinées à éliminer les néo-vaisseaux, surtout la photocoagulation (destruction thermique des vaisseaux anormaux) et la photodynamique (injection par voie intraveineuse d'un produit photosensible).

Bien que le traitement aux anti-VEGF soit plus efficace que les anciennes méthodes, de multiples effets secondaires peuvent découler du traitement, et de nombreux patients n'ont qu'une réponse incomplète ou transitoire à ces traitements. Dès lors, il s'avère essentiel d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques pour

contrôler l'angiogenèse pathologique. Ces cibles pourraient potentialiser les effets des anti-VEGF, et même remplacer les traitements actuels pour traiter ces patients.

1.5 Les principaux facteurs impliqués dans l'angiogenèse

1.5.1 La famille des VEGF

Le VEGF a tout d'abord été identifié comme facteur de perméabilité vasculaire et a été dénommé VPF (*Vascular Permeability Factor*) (Senger et al., 1983). C'est en 1989 qu'il a été décrit comme facteur de croissance après sa purification des cellules endothéliales de la glande pituitaire (Plouët et al., 1989). Après la purification du même facteur des CE dans le milieu de culture primaire de cellules folliculaires d'hypophyse bovine, il a été appelé VEGF (Ferrara and Henzel, 1989). Le VEGF est sécrété principalement par les cellules hypoxiques (Wang et al., 1995).

La famille des VEGF est composée de cinq membres principaux. Le membre le plus important impliqué dans l'angiogenèse est le VEGF-A (phase d'activation). Plusieurs autres membres de cette famille jouent aussi un rôle important dans l'angiogenèse. Le VEGF-B se lie principalement au VEGFR-1 et est impliqué dans l'angiogenèse et la prolifération des CE (Olofsson et al., 1996). Le VEGF-C (Lee et al., 1996), qui se lie au VEGFR-2 et au VEGFR-3, joue un rôle primordial dans le développement des vaisseaux lymphatiques (Wang et al., 2016, García-Caballero et al., 2016). Le VEGF-D et *Placenta Growth Factor* (PlGF) sont impliqués dans l'expression de gènes qui jouent un rôle dans la croissance des CE vasculaires et lymphatiques (Orlandini et al., 1996, Maglione et al., 1991).

La famille des VEGF compte trois récepteurs principaux: Le VEGFR-1, appelé FLT1 (*FMS-Like-Tyrosine kinase*), le VEGFR-2 (FLK1) (*Fetal Liver Kinase*); *Kinase Domain Receptor* (KDR)) (Terman et al., 1992) et le VEGFR-3 (FLT4) (Aprelikova et al., 1992). De plus, l'existence d'un récepteur soluble, VEGFR-1s, qui contient la région extracellulaire du VEGFR1 et qui agit comme trappe pour le VEGF a aussi été démontrée (Kendall and Thomas, 1993). Finalement, les NRP1 et NRP2, des récepteurs aux Sémaphorines dans le système nerveux, peuvent aussi interagir avec le VEGF chez les CE et participer à la transmission du signal (Neufeld et al., 2002).

Les différents VEGF montrent une spécificité pour des récepteurs spécifiques. VEGF-A se lie à VEGFR-1 et VEGFR-2 (de Vries et al., 1992) et à NRP1 et NRP2 chez les CE alors que VEGF-C et VEGF-D se lient à VEGFR-3 chez les CE du système lymphatique (Taipale et al., 1999). VEGF-B et PIGF se lient à VEGFR1 et NRP1. PIGF peut se lier aussi à NRP2 contrairement à VEGF-B. VEGF-C peut aussi se lier à VEGFR-2, cette liaison étant impliquée dans l'angiogenèse embryonnaire (Joukov et al., 1996)(Figure-1.6).

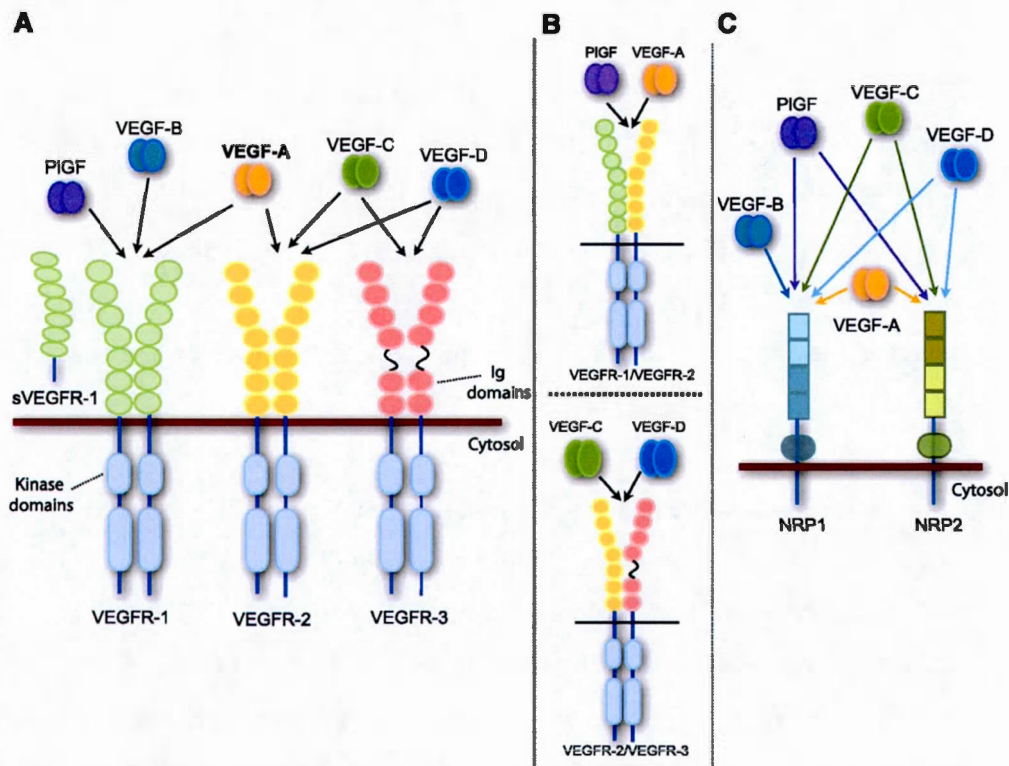


Figure 1.6 : Schéma démontrant la liaison des VEGF à leurs récepteurs.

Page 15.(Ruiz de Almodovar et al., 2009).

1.5.2 La famille des BMP

1.5.2.1 Bref histoire

Les BMP appartiennent à une grande famille de cytokines incluant les *transforming growth factor- β* (TGF- β), *growth and differentiation factors* (GDFs) et *anti-müllerian hormone* (AMH) (Wozney et al., 1988). Il a été démontré que ces protéines peuvent induire la formation de cartilage et d'os ectopique chez les

rongeurs (Reddi, 1992; Wozney et al., 1988). Les BMP sont particulièrement importants pour le développement embryonnaire où ils sont impliqués dans l'orientation et la spécification cellulaire tels que l'orientation dorso-ventrale du mésoderme embryonnaire et la spécification des cellules de l'épiderme et de certaines cellules composant le cartilage et les os (Harland, 1994; Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997) (Tableau-2). Des études ultérieures ont démontré que les BMP sont impliqués dans la prolifération, la migration ainsi que dans l'apoptose dans plusieurs tissus (Massagué and Chen, 2000; Miyazono et al., 2010).

1.5.2.2 La structure des BMP

Les BMP sont synthétisées en chaîne de protéines qui sont constituées d'un groupe amino (N) terminale du peptide signal, et d'un groupe carboxy (C) terminal bioactif. Les BMP sont produits dans le cytoplasme sous forme de complexe pro-protéines dimérique. Pour que les BMP se lient à leurs récepteurs, elles doivent être clivées par des endoprotéases, comme la BMP4 qui est clivée par les furines PC6 et PC7 (Nelsen and Christian, 2009), pour générer les fragments N-terminaux et C-terminaux (Bragdon et al., 2011). Les BMP, sous leur forme biologique active (dimérique), ont un poids moléculaire qui varie entre 30 et 38 kDa (Wan and Cao, 2005).

1.5.2.3 Les membres de la famille des BMP

La famille des BMP est sous-divisée en plusieurs sous-groupes qui comprennent les BMP2/4, BMP 5/6/7/8, GDF 5/6/7 et BMP9/10 (Kawabata et al., 1998). Nous décrirons en détails plus loin les BMP9 et BMP10, qui forment un sous-groupe et sont critiques dans le développement cardiovasculaire.

1.5.2.4 Mécanisme d'action des BMP

Les BMP sous forme active (forme dimérique) se lient à des récepteurs à activité serine/thréonine Kinase de type I et II au niveau de la membrane plasmique. Les récepteurs de type II, qui sont constitutivement actifs, trans-phosphorylent les récepteurs de type I en présence d'un ligand, ce qui induit le recrutement des facteurs R-Smad (facteurs de transcription qui transmettent le signal des Smad 1,5 et 8). Lorsque phosphorylés par les récepteurs de type I, les R-Smads vont s'associer au Co-Smad (Smad4) et ce complexe va être transloqué dans le noyau et former des interactions avec l'ADN, ce qui module l'activité des gènes cibles (Figure-1.7).

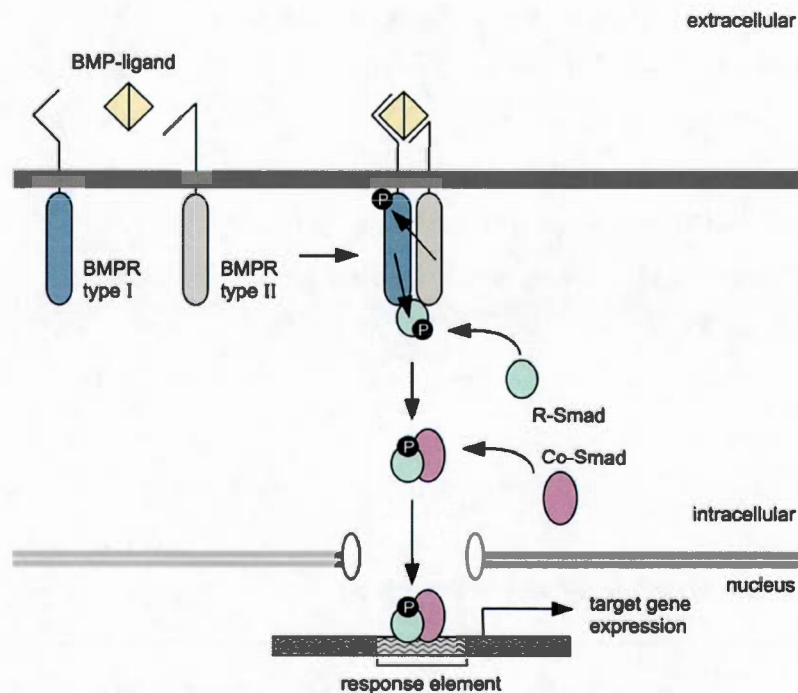


Figure 1.7: Mécanisme d'action des BMP. Page 18 (Balemans and Van Hul, 2002).

1.5.2.4.1 Les régulateurs aux BMP

L'activité des BMP est régulée par plusieurs modulateurs intracellulaires et extracellulaires. Un grand nombre d'antagonistes solubles extracellulaires se lient aux BMP et bloquent leur interaction avec les récepteurs (Canalis et al., 2003). Ces antagonistes incluent entre autre la *Matrix Gla Protein* (MGP), une petite protéine qui peut se lier et inhiber la BMP2 et BMP4 par interaction directe (Hagihara et al., 2011; Wallin et al., 2000) et la noggine, qui forme un complexe avec BMP2, BMP4 et BMP7 (Zimmerman et al., 1996). Parmi tous les BMP, les BMP9 et BMP10 se démarquent par une absence de liaison à la noggine (Seemann et al., 2009). Enfin, la chordine est un antagoniste extracellulaire qui se lie aux BMP2, BMP4 et BMP7. On retrouve aussi plusieurs protéines dont la séquence est proche de la chordine, comme BMPER (*BMP binding Endothelial cell precursor-derived Regulator*) appelé aussi crossveinless-2. La BMPER peut inhiber comme elle peut stimuler la voie des BMP (Dyer et al., 2014). La présence des antagonistes aux BMP est importante pour le développement embryonnaire, leur absence pouvant provoquer plusieurs malformations systémiques dont des défauts des os, ainsi que dans la formation rénale (Walsh et al., 2010).

1.5.2.5.2 Les récepteurs aux BMP

Comme précédemment mentionné, l'activité des BMP requièrent l'activation de complexes de récepteurs. Ces récepteurs sont sous-divisés en trois sous-catégories, les récepteurs de type I, II et III. Les récepteurs de type I sont appelés des ALK (*Activine-receptor Like Kinase*) et ont une grande similarité surtout au niveau du domaine kinase. Il existe sept récepteurs de type I (de ALK1 à ALK7). Chaque ALK a le pouvoir de lier les cytokines d'une ou plusieurs membres de la famille des TGF- β . En réponse à la liaison de leur ligand, ils vont recruter et phosphoryler les facteurs Smad.

Cinq récepteurs de type II ont été décrits : ActRIIA, ActRIIB (*Activine Receptor* de type II A et B), BMPRII (*BMP Receptor* type II), TGF- β RII (*TGF- β Receptor* type II) et AMHRII (*AMH Receptor* type II). Ces récepteurs ont comme particularité d'être activés de façon constitutive. En réponse à un ligand, ils vont former un complexe avec les récepteurs de type I, qu'ils vont phosphoryler, menant à leur activation et au recrutement des Smads. Enfin, les récepteurs de type III sont représentés par Endogline (ENG) et le Bétaglycan. Ces récepteurs sont caractérisés par un long domaine extracellulaire et une courte queue cytoplasmique. Leur rôle est encore relativement incompris, mais des études suggèrent qu'ils modulent l'activité et le trafficking du complexe formé par les récepteurs de type I et de type II (Guerrero-Esteo et al., 2002). Dès lors, ils agissent souvent comme corécepteurs.

Structure des Récepteurs de type I et type II

Ce sont des glycoprotéines de 50-60 kDa pour les récepteurs de type I et de 70-80 kDa pour les récepteurs de type II. Ils ont 3 grands domaines : un domaine extracellulaire, domaine membranaire et un domaine kinase intracellulaire.

Le domaine extracellulaire est situé du côté N-terminal de la séquence peptidique. Lors de la maturation du récepteur, la séquence signal est clivée. Ce domaine est N-glycosylé et contient au minimum 10 cystéines qui déterminent sa structure. La boîte cystéine est une région caractéristique de ces récepteurs, formée par trois cystéines, se trouvant proche du domaine transmembranaire et est impliquée dans la liaison du ligand (Wrana et al., 1994a).

Le domaine intracellulaire comprend 3 sous-domaines : la boîte GS, le domaine Kinase et la queue cytoplasmique. La boîte GS est présente exclusivement dans les récepteurs de type I, se trouvant juste avant le domaine kinase, et étant composée de 30 acides aminés. L'appellation de cette boîte est inspirée de sa séquence spécifique

(SGSGSG) qui est le site de phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II (Wrana et al., 1994b).

Le domaine Kinase a une séquence canonique de sérine/kinase (Mathews and Vale, 1991). Les études sur la structure du domaine kinase ont dévoilées la présence d'un feuillet $\beta 3$ qui joue un rôle dans la liaison avec l'ATP (Cárcamo et al., 1994; Wrana et al., 1992).

Récepteurs de type III

Le bétaglycan est un protéoglycan, contenant un long domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et cytoplasmique très court dépourvu d'activité kinase. Le domaine extracellulaire possède deux sites de fixation des glycosaminoglycanes, et un site N- et O- glycosylation (Henis et al., 1994). Il peut lier les trois isoformes des TGF- $\beta 1$. Le bétaglycan est un récepteur ubiquitaire (Dong et al., 2007), y compris dans les cellules cancéreuses comme le cancer du sein (Dong et al., 2007) et dans le cancer du poumon (Finger et al., 2008). Il est important dans la régulation du développement, de la différenciation et de la croissance tumorale (Bilandzic et al., 2009; Compton et al., 2007; Stenvers et al., 2003). Le bétaglycan inhibe la formation du complexe avec les récepteurs de type II, et inhibe la signalisation de BMP2 (Kirkbride et al., 2008; Lewis et al., 2000).

Endogline, appelée aussi CD105, est une glycoprotéine exprimée à la surface des CE (Gougos and Letarte, 1990). Elle est aussi exprimée dans d'autres types cellulaires comme les monocytes (Gougos and Letarte, 1988), les cellules souches hématopoïétiques (Lastres et al., 1992) et les cellules conjonctives (O'Connell et al., 1992). Elle se présente sous forme dimérique et est composée d'un long domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique dont l'activité kinase semble inactive. Elle contient aussi comme le Bétaglycan des sites N- et O- glycosylation, mais ne possède pas de chaîne

glycosaminoglycane. Elle peut se lier à TGF- β 1, TGF3 en présence de T β R2 et à BMP9 (Scharpfenecker et al., 2007) en présence de ALK1. Comme la plupart des récepteurs aux BMP, Endogline a des effets biologiques importants, pouvant inhiber la migration et la prolifération des CE (Sanz-Rodriguez et al., 2004).

Gènes	modèle animal	Maladies Humaines	Références
<i>Bmp 2</i>	KO: mort de l'embryon avec un défaut dans le développement cardiaque. Het: prédisposition à une hypertension pulmonaire hypoxique associée à une réduction de l'expression de l'endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS).	Inconnu	(Anderson et al., 2010; Zhang and Bradley, 1996)
<i>Bmp 4</i>	Het: hyper-tension pulmonaire hypoxique (moins sévère), prolifération des cellules musculaires lisses et troubles dans le remodelage vasculaire.	Inconnu	(Frank et al., 2005)
<i>Bmpr2</i>	Het: hyper-tension pulmonaire	PAH	(Hong et al., 2008)
<i>Alk1</i>	KO: mort embryonnaire (E10.5) et troubles dans le remodelage vasculaire. Het: HHT de type2	HHT	(Oh et al., 2000; Park et al., 2008)
<i>Alk3</i>	Mésoderme conditionnel KO: mort embryonnaire (E10.5-11.5), hémorragie, une diminution du remodelage vasculaire. Souris adulte: diminution du remodelage vasculaire.	Inconnu	(El-Bizri et al., 2008; Park et al., 2006)
<i>Endogline</i>	KO: mort embryonnaire (E10.5) dues à un défaut de formation de vaisseaux matures.	HHT	(Mahmoud et al., 2010)
<i>Smad1</i>	KO: mort embryonnaire (E9.5) due à un défaut de formation d'allantoïde, avec une malformation du système circulatoire.	Inconnu	(Lechleider et al., 2001)
<i>Smad4</i>	KO: mort embryonnaire (E10.5) due à un défaut de formation cardio-vasculaire.	HHT	(Lan et al., 2007)
<i>Smad5</i>	KO: mort embryonnaire (E9.5-E11.5) due à un défaut cardiaque et angiogénique.	Inconnu	(Chang et al., 1999)
<i>Smad6</i>	KO: défaut cardio-vasculaire, calcification vasculaire, hyper-tension	MVC	(Tan et al., 2012)
<i>Smad7</i>	KO: mort embryonnaire due à un défaut de formation cardio-vasculaire.	Inconnu	(Chen et al., 2009)
<i>Smad8</i>	Mutation de Smad8 chez la souris: remodelage vasculaire pulmonaire défectueux.	PAH	(Huang et al., 2009)00

Tableau-1.2 : Effet de l'absence des BMP chez la souris et l'humain.

PAH : *Pulmonary Arterial Hypoertension*

HHT : *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*

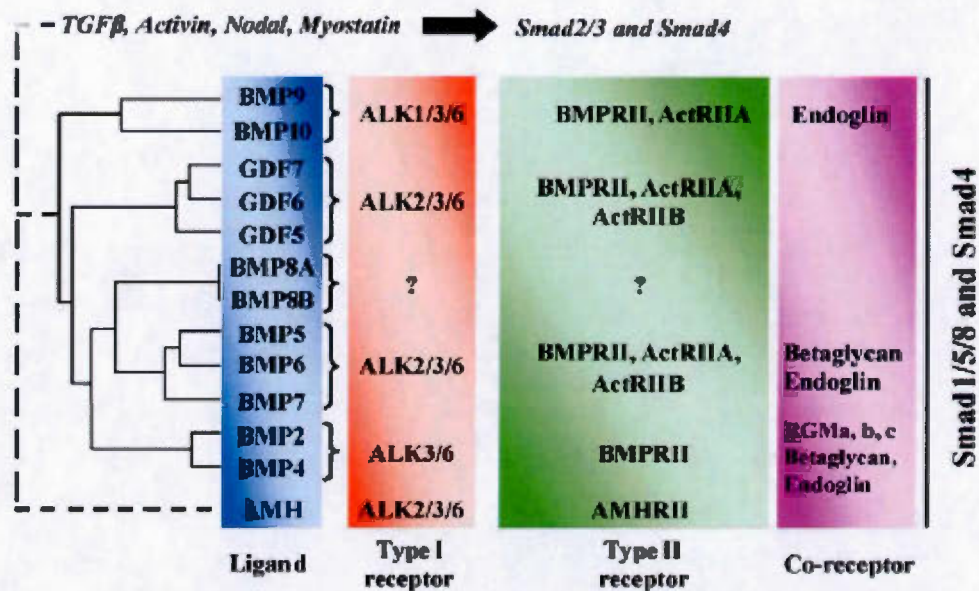


Figure 1.8 : Schéma démontrant la liaison des BMP à leurs récepteurs.
Page de 19 à 22 (David et al., 2009).

1.5.2.5.3 Activation des voies de la famille des BMP

La première étape de la signalisation des BMP est la liaison du ligand aux récepteurs. Cette liaison mène à la formation d'un complexe hétéro-tétramérique composé de deux récepteurs de type I et de deux récepteurs de type II. Certains ligands ont une forte affinité pour les récepteurs de type II par rapport à celle des récepteurs de type I. Ainsi, la BMP7 lie préférentiellement ActRIIA et ActRIIB tandis que d'autres ont plus d'affinité pour les récepteurs de type I, se liant d'abord au récepteur de type I, comme BMP2 sur ALK3 et BMP4 sur ALK6 (Knaus and Sebald, 2001; Koenig et al., 1994) ou encore BMP9-BMP10 sur ALK1 (David et al., 2007a). Cette liaison conduit au changement de la forme du complexe ainsi qu'à la phosphorylation du récepteur de type I, induisant l'activation du signal. Ce signal est

traduit par l'internalisation du complexe par endocytose dans le cytoplasme cellulaire.

1.5.2.5.4 L'internalisation du complexe en présence du ligand

Une des étapes importantes dans la signalisation des BMP, est l'internalisation des récepteurs. Après stimulation des récepteurs avec un ligand, un complexe hétérotétramère se forme. Ce complexe s'internalise dans le cytoplasme de la CE. Deux modes d'internalisation des récepteurs aux BMP sont connus: l'endocytose par les puits de clathrine ou l'endocytose par les cavéoles (Di Guglielmo et al., 2003; Hartung et al., 2006) (Figure-1.9) .

La clathrine est une protéine qui se trouve sur la face interne de la membrane du cytoplasme. Elle conduit, en partenariat avec la dynamine à la formation des puits pour l'internalisation. Les vésicules internalisées perdent leur membrane de clathrine et deviennent des endosomes précoces. Le second type est l'internalisation par cavéoles, qui est une invagination de la membrane plasmique au niveau du radeau lipidique.

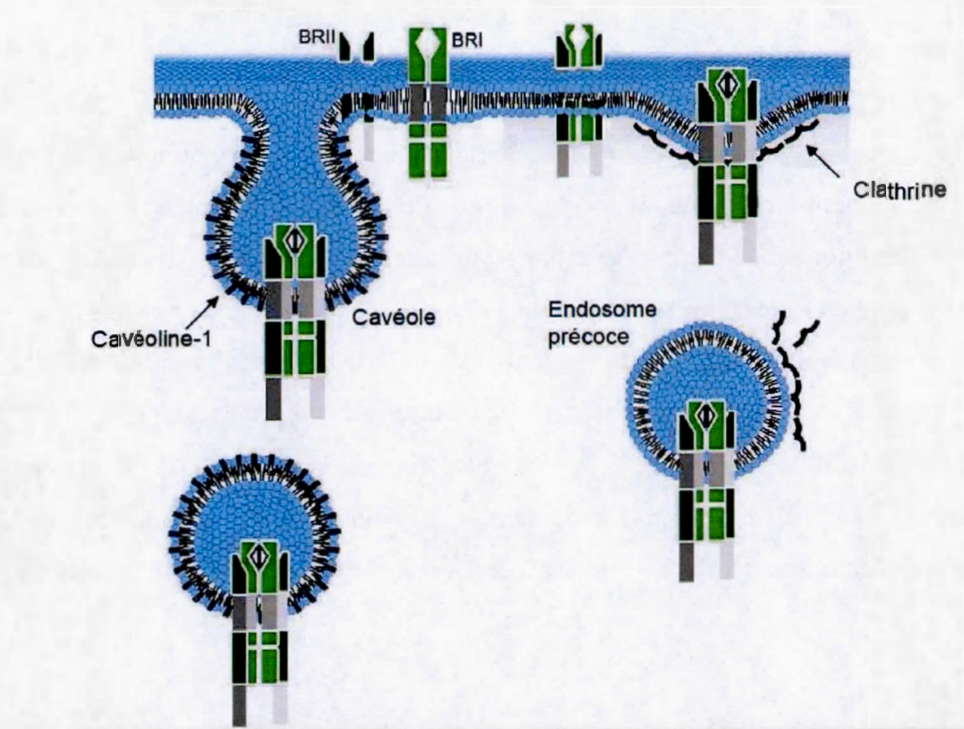


Figure 1.9: Schéma démontrant le mode d'internalisation des récepteurs aux BMP.

Page 24 (Nicolas, 2013).

1.5.2.5.5 Voies de signalisations

Voie des Smad:

La liaison d'un ligand BMP avec un récepteur de type I peut mener à la formation de plusieurs hétéro-complexes, qui déterminent la spécificité de la signalisation. Le récepteur de type I initie la signalisation par la phosphorylation du récepteur des voies Smad (R-Smad). De façon générale, les récepteurs aux BMP

(ALK1, ALK2, ALK3 et ALK6) activent les Smad1, Smad5 et Smad8, alors que Smad2 et Smad3 sont phosphorylés par les récepteurs à l'activine et aux TGF- β (ALK4, ALK5 et ALK7).

Outre les R-Smads, deux autres types des Smad ont été identifiés, le médiateur commun Smad (co-Smad : Smad4), et les inhibiteurs des Smads (I-Smad : Smad6 et 7). L'activation des récepteurs aux BMP induit la phosphorylation des R-Smads qui s'assemblent avec Smad4, menant à la formation d'un complexe hétéromère. La translocation de ce complexe se fait au niveau du noyau où il participe directement à la modulation de l'expression de plusieurs gènes cibles. Ces complexes ne possèdent pas de forte affinité pour l'ADN, mais se lient à la cible des promoteurs de gènes en association avec d'autres facteurs de transcription (Miyazono et al., 2005). La phosphorylation des Smad1, 5 et 8 est détectée chez les CE de l'aorte de souris fraîchement isolées et dans l'endothélium pulmonaire, ce qui suggère que les CE sont physiologiquement activés par les BMP (Frank et al., 2008; Valdimarsdottir et al., 2002).

Structure des Smad

Les Smads sont composés de deux domaines: un domaine N-terminal appelé MH1 (*Mad Homology 1*) et un domaine C-terminal appelé MH2 (*Mad Homology 2*). Le domaine MH1 est présent seulement dans les R-Smad et Smad4 et contient le site de liaison des Smad à l'ADN (Shi et al., 1998). À l'état basal (non activé) le domaine MH1 se lie au domaine MH2 (Hata et al., 1997), cette liaison bloquant la liaison à l'ADN (Kim et al., 1997) et empêchant les effets transcriptionnels de MH2 (Liu et al., 1996). Le domaine MH2 est présent dans tous les Smad (1 à 8). Ce domaine est le site d'interaction des Smad avec plusieurs protéines, permettant aux Smad de former des oligomères (Hata et al., 1997).

Autres voies

Bien qu'il ait été démontré que les BMP activent principalement la voie des Smad, ils peuvent aussi activer d'autres voies de signalisation comme les MAP Kinase, la phosphoinositol (PI)3 Kinase/Akt et protein Kinase C (PKC), ainsi que Rho-GTPase .

Les MAP Kinases sont des protéines kinase qui sont impliquées de nombreux processus biologiques, notamment la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. Elles sont activées dans les cellules épithéliales de rat suite à une stimulation par TGF- β (Mulder and Morris, 1992). Les MAPKinases peuvent être divisées en trois sous familles : ERK, JNK et p38 kinase. L'activation de la voie ERK par les TGF- β dans différents types cellulaires comme les cellules cancéreuses et épithéliales a été la cible de plusieurs études (Frey and Mulder, 1997; Hartsough and Mulder, 1995; Mucsi et al., 1996). La voie JNK peut être activée par les TGF- β (Ploemacher et al., 1999), ainsi que par la voie p38 (Hanafusa et al., 1999; Sano et al., 1999).

Les TGF- β peuvent aussi activer la voie des PI3 kinase/Akt (Wilkes et al., 2005), une voie impliquée dans la survie cellulaire, et la voie des Rho-GTPases (Bhowmick et al., 2001) qui est impliqué dans le control dynamique du cytosquelette , la mobilité cellulaire et l'expression des gènes.

Ces voies non-Smad, bien qu'ils sont peu caractérisées dans le contexte de la signalisation des TGF- β , sont importantes dans la création, la diversité et l'ajustement des signaux générés par les ligands de cette famille (Massagué and Chen, 2000; Mulder, 2000).

1.6 BMP9-BMP10-ALK 1, nouvelle cible thérapeutique en angiogenèse

Plusieurs études génétiques, pharmacologiques, et histopathologiques démontrent le rôle de la signalisation d'ALK1 dans la régulation de la formation des vaisseaux sanguins (Hu-Lowe et al., 2011; Oh et al., 2000), expliquant l'intérêt croissant porté à ALK1 en tant que cible thérapeutique pour compléter les traitements anti-angiogéniques existants. Actuellement, un ligand-trappe soluble d'ALK1 (acceleron Pharma) et un anticorps anti-ALK1 (Pfizer) sont dans des essais cliniques pour le traitement des tumeurs avancées (Cunha and Pietras, 2011).

1.6.1 ALK1

ALK1 a été cloné pour la première fois à partir du tractus urogénital d'un embryon de rat et a été nommé SKR-3 (*Serine/threonine-Kinase Receptor 3*) (He et al., 1993). Il a été aussi cloné chez l'humain et fut appelé TSR-1 (*TGF- β Superfamily Receptor type 1*) (Attisano et al., 1993; ten Dijke et al., 1994). Il est exprimé principalement dans les CE (Panchenko et al., 1996). La mutation de son gène *ACVRL1* est responsable de la maladie de Rendu-Osler de type 2 (maladie vasculaire caractérisée par des malformations artério-veineuses) (Johnson et al., 1996). Des études chez la souris ont démontré le rôle primordial de ALK1 au cours du développement vasculaire (Roelen et al., 1997) (Tableau-2).

1.6.1.1 Rôle de ALK1 dans le développement

Chez l'humain

La télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT), appelée aussi la maladie Osler-Weber-Rendu, est une maladie autosomique dominante vasculaire. La majorité des cas sont causés par des mutations dans les gènes codant soit pour le récepteur ALK1 (*ACVRL1*) (HHT-2) ou pour le récepteur endogline (HHT-1). Elle est

caractérisée par des télangiectasies (dilatations des petits vaisseaux sanguins situés près de la surface de la peau ou des muqueuses, caractérisées par des connections artério-veineuses anormales) dans le nez, la cavité buccale et des voies gastro-intestinales, ainsi que des malformations artério-veineuses superficielles (MAV) (Shovlin et al., 1997 ; Shovlin et al., 2010). Elle se caractérise par la présence d'une communication anormale (*shunt*) entre les artères et les veines avec un hémodétournement (absence de vascularisation du réseau capillaire et un retour veineux précoce artérialisé) dans plusieurs organes, y compris les poumons, le foie et le cerveau, ce qui peut entraîner des lésions ischémiques sévères ou des accidents vasculaires cérébraux (Shovlin, 2010).

In vitro

La surexpression d'ALK1 constitutivement actif (ALK1ca) dans plusieurs types de CE inhibe la prolifération et la tubulogénèse (Ota et al., 2002)(Lamouille and Derynck, 2007). A l'opposé, la diminution de l'expression d'ALK1 par siRNA augmente la migration de plusieurs types de CE comme les HMVECd (*Human Microvascular Endothelial Cells for the Dermis*) (David et al., 2007b). Par contre, il a été montré que la surexpression d'ALK1ca favorise la migration chez les MEEC (*Mouse Embryonic Endothelial Cells*) et stimule la prolifération chez les BAEC (*Bovine Aortic Endothelial Cells*) (Goumans et al., 2002).

In vivo

Dans des modèles murins, la perte d'ALK1 cause la mortalité embryonnaire à E11.5 suite à un défaut de remodelage du plexus capillaire primaire (Urness et al., 2000). Chez le poisson zèbre, la mutation de *Acvr11* résulte en une malformation artérielle avec un flux sanguin contraint d'un nombre limité de

vaisseaux crâniens hyperprolifératifs. ALK1 joue aussi un rôle dans la quiescence vasculaire pendant le développement vasculaire (Corti et al., 2011; Roman et al., 2002). ALK1 contribue également à l'homéostasie des vaisseaux adultes. Suite à la délétion globale du gène *Acvr11* par le traitement à la tamoxifene chez les souris post-natales, des malformation artério-veineuses ainsi que des hémorragies internes apparaissent sévères (Park et al., 2008, 2009). De plus, le blocage d'ALK1 par un anticorps bloquant induit une hypervascularisation et des malformations artério-veineuses des rétines murines (Larrivée et al., 2012).

1.6.1.2 Signalisation de ALK1

La liaison de ALK1 par son ligand induit principalement la phosphorylation des Smad1/5/8 (Macías-Silva et al., 1998). Il a également été démontré que ALK1 peut faiblement induire la phosphorylation de Smad2, et non Smad3 (Upton et al., 2009). La signalisation de ALK1 est activée principalement par deux ligands circulants, les BMP9 et BMP10 (David et al., Mar 1, 2007a; Scharpfenecker et al., 2007). Plusieurs molécules à la surface des CE, telles VE-cadherine et Endogline, sont impliquées dans la formation des complexes de récepteurs/ligands BMP et contribue à l'internalisation de ALK1 (Rudini et al., 2008).

1.6.1.3 Expression des gènes suite à l'activation de la voie ALK1

Des études ont démontré que la liaison de ALK1 avec son ligand BMP9 peut activer l'expression de plusieurs gènes endothéliaux dont ID (*Inhibitor of differentiation*) 1, 3, HEY1, 2 et HES, ces facteurs étant impliqués dans la migration, la différenciation et la prolifération des CE (Larrivée et al., 2012). Les ID appartiennent à la sous-famille des *b Helix Loop Helix* (bHLH). Il s'agit d'une famille composée de quatre protéines impliquées dans le contrôle de différenciation

et progression du cycle cellulaire dans l'organisme (Benezra et al., 2001). Tous les ID (ID1, 2, 3, et 4) ciblent des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes spécifiques dans la différenciation des cellules et dans la régulation du cycle cellulaire (Chen and Lim, 1997). Id1 et Id3 sont co-exprimés temporellement et spatialement pendant l'angiogenèse (Jen et al., 1997). ID1 et ID3 sont retrouvés dans les CE du cerveau, alors que ID1, 2 et 3 sont exprimés dans toutes les autres CE (Jen et al., 1997; Neuman et al., 1993). Des études ont démontré que l'inhibition des Id diminue l'expression du VEGF. De plus la diminution de l'expression de l'ID1 et 3 mène à des défauts neuro-angiogéniques chez l'embryon murin (Jen et al., 1997).

Plusieurs autres gènes régulés par ALK1 sont impliqués dans la guidance des *tips/stalk cells*. Ainsi, l'*apelin* est un gène impliqué dans la guidance des *tip cells* en se liant à son récepteur APJ dans les *stalk cells*. Des mutations d'*apelin* chez la souris ou le poisson zèbre résultent en un retard dans le développement vasculaire et une réduction de la prolifération des *stalk cells* exprimant le récepteur à l'*apelin* (APJ) (del Toro et al., 2010b). Unc5B est un des récepteurs impliqués dans la guidance des CE et la différenciation artérielle. Son activation assure le maintien de l'intégrité vasculaire (Koch et al., 2011). Unc5B est fortement exprimé dans les *tip cells* et son inactivation favorise la germination (Adams and Eichmann, 2010). De plus, en absence de ses ligands (ROBO4 ou Netrin-1), UNC5B induit l'apoptose des CE (Castets and Mehlen, 2010).

Des études ont remarqué la diminution de l'expression du gène EphrinB2 dans les CE des souris mutées pour ALK1 (*Acvr11*). EphrinB2 et son ligand EphB4 sont respectivement des marqueurs artériels et veineux jouant un rôle direct dans la prévention des anastomoses artério-veineux (Gale et al., 2001; Shin et al., 2001). Plusieurs études ont démontré l'implication de EphrinB2 dans la morphologie et la motilité des CE (Bochenek et al., 2010; Héroult et al., 2010).

1.6.1.4 Récepteurs de type II impliqués dans la signalisation de ALK1

Des études ont démontré que ALK1 pouvait former un complexe avec trois récepteurs de type II en présence de ses ligands BMP9 et BMP10 : ActRIIA, ActRIIB et BMPRII (Townson et al., 2012) .

ActRIIA et ActRIIB

Les ActRII sont des récepteurs à activité kinase serine/thréonine (Mathews and Vale, 1993). Ils sont phosphorylés de façon constitutive, et vont phosphoryler un récepteur de type I en présence de leur ligand. En addition à l'Activine, ces récepteurs peuvent également lier les BMP2 et BMP7 (Macías-Silva et al., 1998), et BMP9 et BMP10 (Thompson et al., 2003) (Figure-1.8) .

Le rôle biologique des ActRII a été étudié dans certains organes de reproductions comme, les gonades de l'utérus et de l'hypophyse, Où ils sont impliqués dans la folliculogénèse, la spermatogénèse et la grossesse (Welt et al., 2002). Des études sur le développement ovarien chez l'humain et la souris démontrent l'implication des ActRII dans la régulation de la prolifération des cellules germinales au cours de la formation des follicules primordiaux, qui se produisent après 21 semaines de gestation chez l'humain et 24 heures chez la souris (Bristol-Gould et al., 2006; Martins da Silva et al., 2004). La diminution de la signalisation des ActRII par baisse de leurs expression chez la souris, résulte en des testicules petits de taille ainsi que la réduction de la fertilité (Matzuk et al., 1995). De plus les ActRII peuvent réguler le taux de glucose, stimulant la sécrétion de l'insuline dans les cellules β des rats et des humains en culture (Florio et al., 2000; Totsuka et al., 1988; Verspohl et al., 1993) et augmentant la prolifération des cellules β (Brun et al., 2004; Li et al., 2004). Des études ont aussi démontré que les ActRII (Jones et al., 2004), et les BMP (Gould et al., 2002; Hagen et al., 2007) sont impliqués dans la

régulation de l'inflammation dans différents tissus et organes comme les interleukines (IL) 6, les cytokines et les muscles lisses pulmonaire. Cependant, leur rôle dans le développement vasculaire n'a pas été étudié.

BMPRII

Le BMPRII peut interagir avec BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP10 et GDF5 mais ne se lie pas à l'activine ou TGF- β . Ce récepteur est actif de manière constitutive, ne possédant pas de domaine intracellulaire GS. Des études démontrent que BMPRII se lie à une très faible dose aux BMP en absence d'un récepteur de type I (Liu et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995).

BMPRII a un rôle biologique très important, sa mutation étant la principale cause de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (Deng et al., 2000; International PPH Consortium et al., 2000), qui est une maladie rare qui touche 1,5 personnes/million dans le monde. Elle est caractérisée par une résistance vasculaire pulmonaire chronique élevée, cette résistance conduisant à une faiblesse du cœur droit, des handicaps graduels, et à la mort du patient. Cette maladie est causée par une augmentation de la paroi vasculaire due à une prolifération excessive des CE et des cellules musculaires lisses et à un dépôt de collagène et une nécrose fibreuse résultant à des liaisons plexi-formes (Pietra, 1994).

1.6.2 BMP9

1.6.2.1 Généralités

La BMP9, appelée aussi GDF2 (*Growth and Differentiation Factor-2*), a été découverte et clonée à partir d'ADNc de souris (Song et al., 1995) et sa structure cristallographique a été accompli en 2005 (Brown et al., 2005). Elle est composée de

429 acides aminés qui contiennent un peptide signal de 295 acides aminés ainsi que d'une région mature qui contient 108 acides aminés. Elle est sécrétée principalement par les hépatocytes du foie (Song et al., 1995), ainsi que dans le système nerveux central à partir de E14 chez la souris et dans les ostéoblastes humains (López-Coviella et al., 2000; Miller et al., 2000; Song et al., 1995; Suttapreyasri et al., 2006). La BMP9 produite par le foie circule dans le sang à des doses biologiquement actives. la dose moyenne du BMP9 dans le sérum humain étant de 5ng/ml (David et al., 2008).

1.6.2.2 Effets du BMP9

In vitro

Il a été rapporté que la BMP9 inhibe la migration et la croissance des CE (David et al., 2007a). Plusieurs études ont démontré que la BMP9 peut aussi inhiber la formation des nouveaux réseaux vasculaires (Larrivée et al., 2012). Bien que des fortes doses de la BMP9 semblent avoir un effet inhibiteur sur les CE, une autre étude a démontré qu'une faible dose de BMP9 induit la prolifération dans divers types de CE in vitro et induit l'angiogenèse dans des essais de matrigel et dans le cancer du pancréas chez l'humain (Heinke et al., 2008). Il est probable que la BMP9 possède des effets différents sur les CE en fonction du contexte cellulaire et de sa concentration. Une étude récente du laboratoire de K.Pietras a montré qu'il existe des effets complexes entre TFG- β et BMP9 sur les CE, la combinaison de deux facteurs résultant en un effet pro-prolifératif. De plus, ils démontrent que le traitement des CE par TGF- β et BMP9 entraîne une sensibilisation des CE aux facteurs de croissances angiogéniques comme le VEGF (Cunha et al., 2010).

In vivo

La BMP9 inhibe la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques (Ploemacher et al., 1999). Des études ont démontré que la BMP9 a un effet ostéogénique, l'injection du BMP9 recombinante chez le rat ou la souris contribuant à la réparation des lésions osseuses (Alden et al., 2000; Helm et al., 2000; Li et al., 2003a, 2003b, 2005). La BMP9 joue également un rôle dans l'ossification des muscles après les blessures (Leblanc et al., 2011). De plus, la BMP9 est impliquée dans la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones cholinergiques (López-Coviella et al., 2000). Finalement, la BMP9 a un effet anti-angiogénique sur le développement des vaisseaux sanguins dans la rétine de la souris (Larrivée et al., 2012).

1.6.3 BMP10

La BMP10 est un ligand pour le récepteur ALK1 (David et al., 2007a), exprimé principalement dans le cœur embryonnaire et adulte, dans le foie et les poumons (Neuhaus et al., 1999). Elle a une structure semblable au BMP9 ce qui explique son affinité pour ALK1.

La BMP10 favorise la prolifération des cardiomyocytes (Nakano et al., 2007). Une étude démontre qu'elle a un rôle pro-apoptotique sur le cancer de la prostate (Ye et al., 2009) et elle a aussi un effet antiprolifératif sur les cellules du cancer de sein. La BMP10 est de plus impliquée dans le développement cardiaque. Cette protéine est en effet essentielle pour maintenir la croissance cardiaque pendant la cardiogenèse, son déficit chez les souris menant à la mort de l'embryon entre E9,5 et E10,5 dû à un défaut profond dans le développement cardiaque (Chen et al., 2004). En effet, il a été démontré que la BMP10 joue un rôle crucial pour le dépôt de la matrice pendant le remodelage cardiaque pour assurer une bonne fermeture du canal artériel (Levet et al., 2015). Enfin, par son interaction avec ALK1, la BMP10 a également un rôle important durant le remodelage vasculaire (David et al., 2007).

1.6.4 Complexe des récepteurs en présence de BMP9/BMP10

Une étude a proposé que la présence du ligand BMP9 ou BMP10 conduit à la formation d'un complexe formé d'un dimère de ALK1 et d'un dimère de BMPRII ou ActRIIA (David et al., 2007a). Une autre étude cristallographique vient à confirmer et de compléter ces études, montrant la forte affinité qui existe entre BMP9-ALK1 et les récepteurs de type II (Townson et al., 2012) (Figure-1.10). Dans la même étude, il a été rapporté que la BMP9 a une plus forte affinité pour ActRIIB que pour BMPRII, alors que la BMP10 a une affinité relativement similaire pour les trois récepteurs de type II.

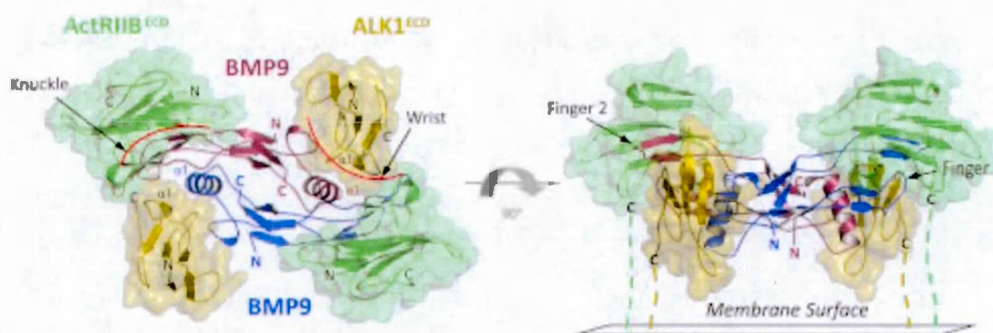


Figure 1.10: Schéma démontrant la forte affinité entre ALK1-BMP9 et les récepteurs de type II. Page 36 (Townson et al., 2012).

1.7 Hypothèse de travail

Dans les CE, la signalisation de ALK1 semble être dépendante du contexte, puisqu'elle peut avoir des effets opposés sur les CE provenant de différents lits vasculaires. Elle est un facteur de quiescence puissant dans certains tissus tels que la rétine, mais elle peut également favoriser l'angiogenèse dans d'autres contextes, tels que la lymphangiogenèse du diaphragme. Une des questions les plus intrigantes est de comprendre comment le même ligand, BMP9, peut susciter une telle diversité de réponses biologiques à travers son récepteur ALK1. Notre principale hypothèse argumente que les récepteurs de type II aux BMP peuvent moduler la signalisation d'ALK1 chez les CE. Cette théorie principale nous pousse à formuler des hypothèses secondaires : 1) les récepteurs de type II aux BMP formant un complexe avec les récepteurs de type I aux BMP (complexe ALK1, BMP9 et ActRIIB) peuvent moduler les réponses induites par le ligand, telle que la prolifération, la différenciation cellulaire et la migration. 2) Chaque récepteur de type II aux BMP (BMPRII, ActRIIA et ActRIIB) conduit à l'activation de facteurs de signalisation spécifiques. 3) L'expression des récepteurs de type II aux BMP diffère d'un type de cellule endothéliale à un autre ce qui peut expliquer en partie le double effet à la réponse au BMP9 dans différents types des CE. Nous proposons donc de 1) caractériser les effets fonctionnels des récepteurs de type II aux BMP en présence du BMP9 chez les CE, 2) d'évaluer les effets biologiques de ces récepteurs dans la transduction de la signalisation du BMP9 en utilisant des modèles in vitro d'angiogenèse et de vascularisation chez la souris et 3) comparer l'expression des récepteurs de type II aux BMP dans plusieurs CE et tissus pour étudier l'effet de cette différenciation sur l'angiogenèse et le développement vasculaire. Les résultats générés par cette étude devraient nous permettre de mieux comprendre certains des mécanismes impliqués dans la morphogénèse des vaisseaux sanguins.

CHAPITRE II

ARTICLE

Modulation of BMP9/ALK1 signaling in endothelial cells by type II BMP receptors

Ali Belayachi^{1,4}, Khalil Miloudi⁶, Roxanne Collin⁵, and Bruno Larrivée^{1,2,3,4}

¹Department of Biological Sciences, Center of research BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Quebec, Canada and ²Department of Biomedical Sciences, ³Department of Molecular Biology and ⁴Department of Ophthalmology and ⁵Immunology-Oncology Section, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada. ⁶Department of Neurology-Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

Résumé de l'article

Activine receptor-like kinase 1 (ALK1), un récepteur de type I aux BMP spécifique aux cellules endothéliales (CE), joue un rôle important dans le développement des vaisseaux sanguins en interagissant avec ses ligands *Bone Morphogenetic Protein 9* et 10 (BMP9-10). ALK1 peut former des complexes avec trois différents récepteurs de type II aux BMP (ActRIIA, ActRIIB et BMPRII) après stimulation avec la BMP9. Cependant, la contribution des récepteurs de type II sur la signalisation de ALK1-BMP9 n'a pas été étudié en détail. Dans cette étude, nous avons évalué l'implication fonctionnelle de ces récepteurs dans la signalisation de ALK1 dans les CE. Nous avons observé que ALK1 forme principalement des complexes avec BMPRII et ActRIIB dans les CE. Par l'utilisation de modèles de perte de fonction et de surexpression fonctionnelle, nous démontrons que BMPRII est critique pour l'internalisation de ALK1 et la signalisation des Smad, mais est dispensable pour la signalisation non-Smad (Erk, Akt). Fonctionnellement, nous montrons que BMP9 régule négativement la germination endothéliale, la prolifération et la migration des CE, et que BMPRII est nécessaire pour la médiation de ces effets. Cette étude permettra de mieux comprendre les effets de ALK1 pendant l'angiogenèse.

2.1 Summary

Activin receptor-like kinase 1 (ALK1), a specific type I BMP receptor of endothelial cells (ECs), plays a role in the development of blood vessels by interacting with its ligands Bone Morphogenetic Protein 9 and 10 (BMP9-10). ALK1 can form complexes with three different type II BMP-receptors (ActRIIA, ActRIIB and BMPRII) after stimulation with BMP9. However, the contributions of Type II receptors on BMP9-mediated ALK1 signaling have not been studied in details. In this study, we evaluated the functional implication of these receptors in ALK1 signaling in ECs. We observed that ALK1 primarily forms complexes with BMPRII and ActRIIB in ECs. Using loss- and gain-of-function studies, we show that BMPRII is critical for the internalization of ALK1 and downstream Smad signaling, but that it is dispensable for non-Smad signaling (Erk, Akt). Functionally, we show that BMP9 negatively regulates endothelial sprouting, proliferation and migration, and that BMPRII is required to mediate these effects. This study will allow a better understanding of the effects of ALK1 during angiogenesis.

2.2 Introduction

TGF- β superfamily members are important determinants of cellular fate, proliferation and survival. This family of proteins consists of over 30 ligands, including growth and differentiation factors (GDF), bone morphogenetic proteins (BMP), activins as well as seven type I receptors (ALK1–7), and five type II receptors (ActRIIA, ActRIIB, BMPRII, TGF- β RII, and AMHRII) and many co-receptors and accessory proteins.

Typically, BMPs induce cell signaling by forming receptor complexes that include the dimeric ligands, two type I receptors, and two type II receptors. Ligand binding leads to trans-phosphorylation of the type I receptor kinase domain by the constitutively active type II receptor kinase domain, which in turn leads to the activation of Smad signal transduction pathways and to the regulation of expression of target genes. In addition to Smad signaling, TGF- β members have also been shown to use non-Smad signaling pathways such as the p38, Erk1,2, Akt and Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways to convey their signals (David et al., 2007b).

ALK1 is a TGF- β type 1 receptor, whose expression is largely restricted to the endothelium. It binds almost exclusively to BMP9 and BMP10 (David et al., 2007a; Suzuki et al., 2010). Genetic, pharmacological and histological data demonstrate the critical role of ALK1 for the proper morphogenesis of blood vessels and dysfunctions in its signaling are associated with the abnormal development of blood vessels in several pathologies (Cunha et al., 2011). In particular, mutations in ALK1 are associated with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT), a disease characterized by the formation of telangiectasias (small dilated blood vessels located near the surface of the skin or mucous membranes, characterized by abnormal arteriovenous connections) in the nose, oral cavity and gastrointestinal tract, as well

as superficial arteriovenous malformations (AVM), which are direct connections between arteries and veins.

ALK1 signaling is critical for proper vascular development, as mice displaying mutations in the ALK1 gene (*Acvrl1*) die at embryonic day 11.5 (E11.5) due to improper vascular remodeling. Recent studies have demonstrated that ALK1 activation by its ligands BMP9 and BMP10 leads to the inhibition of endothelial cell migration and proliferation induced by VEGF (David et al., 2007a) and to the acquisition of a quiescent phenotype by switching the balance between endothelial tip and stalk cell specification (Larrivee et al., 2012). This effect appears to be context-dependent, as BMP9 has also been reported to promote angiogenesis and the induction of EC proliferation (Suzuki et al., 2010). Furthermore, BMP9 has also been shown to promote the growth of multiple tumor cell lines (Herrera et al., 2009; Herrera et al., 2013). The molecular mechanisms underlying the context-dependent activities of BMP9 are unclear.

We hypothesized that the ligand selectivities of ALK1 and type II BMP receptors may mediate the context-dependent activities of BMP9. Therefore, we explored the relative contribution of type II BMP receptor for the functional responses of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) to BMP9. Our study shows that type II BMP receptors modulate ALK1 signaling in ECs. We demonstrate that BMPRII and ActRIIB are predominantly expressed in HUVECs and that they both form complexes with ALK1 following BMP9 stimulation. While BMPRII is critical for the internalization of ALK1 and the propagation of Smad signaling, it appears to be dispensable for non-Smad signaling (Erk, Akt, JNK). Furthermore, we show that BMP9 signaling in the presence of BMPRII triggers anti-proliferative and anti-migratory signaling. These data highlight the relative impact and functional consequences of type II BMP receptors in the propagation of BMP9/ALK1 signaling in ECs.

2.3 Experimental Procedures

Antibodies and Recombinant Proteins:

Antibodies against BMPRII (ab96826), ActRIIA (ab96793) and ActRIIB (ab76940) were obtained from Abcam while Alk1 antibodies (anti-human ALK1 (AF370) and anti-mouse Alk1 (AF770)) were purchased from R&D Systems. Anti-CD31 (clone M 8903) was obtained from BD Biosciences. Antibodies against pSmad1,5,9 (13820), Smad1 (9743), pErk1,2 (4370), Total Erk1,2 (4695), pAkt (Ser473) (4060) and Total Akt (9272) were obtained from Cell Signaling.

Control siRNAs and siRNAs against ACVRL1, ActRIIB and BMPRII were obtained from QIAGEN (Flexitube siRNA). Data were obtained using at least two different siRNAs targeting different sequences for each gene.

Cell Culture:

HUVECs were obtained from Lonza and cultured in ECGM-2 (Lonza). Cells were starved overnight in EBM-2 supplemented with 0.1% FBS at 37°C in 5% CO₂ prior to stimulation with 10 ng/ml BMP9 and/or 25 ng/ml VEGF.

siRNA transfection :

HUVECs were transfected in 6 well-plates with 25pmol siRNA and 25 pmol lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer. Cells were used for experiments 48h after transfection.

Sprouting assay :

After siRNA transfection, HUVECs (250,000 cells/well in 6-well plates) were resuspended in 300 µL fibrinogen solution (2,5 mg/ml fibrinogen (Sigma) in EBM-2 medium supplemented with 2% FBS and 50 mg/ml aprotinin (Sigma-Aldrich), and plated on top of a precoated fibrin layer (400 ml fibrinogen solution clotted with 1 U

thrombin (Sigma-Aldrich) for 20 min at 37°C). The second layer of fibrin was clotted for 1 hr at 37°C. Human Dermal Fibroblasts (HDF) (250,000 cells/well), in EBM-2 supplemented with 2% FBS and 25 ng/ml VEGF, were then plated on top of the fibrin layer. Cultures were incubated at 37°C, 5% CO₂. Control cultures were grown with VEGF for 2–3 days, VEGF was then removed, and cultures were grown for another 2–3 days in the presence of growth factors (VEGF, BMP9). After 4–6 days, cultures were labeled with 4 mg/ml Calcein AM (Life Technologies) for 1h, and imaged by fluorescence using a standard FITC filter.

Realtime qPCR:

RNA was isolated using the RNeasy Plus Kit (Qiagen). Thereafter, 0.5 µg RNA was retrotranscribed with iScript cDNA synthesis kit (Biorad). Real-time quantitative PCR (qPCR) reactions were performed using ABI 7500 (Applied Biosystems). Quantitative PCR primers (Quantitect primer assays) were obtained from Qiagen. Fold changes were calculated using the comparative CT method.

Western blot analysis:

The protein amount was determined using a BCA protein assay kit (Pierce) and 50 g were separated by SDS PAGE. Thereafter, proteins were transferred to nitrocellulose and membranes were blocked with 5% BSA in Tris-buffered Saline/0.01% Tween 20 for 1h and incubated with primary antibodies in blocking buffer overnight at 4°C. After washing, membranes were incubated with the corresponding secondary antibody for 2 hours at room temperature. Membranes were developed with ECL (Biorad) and images acquired with a LAS-3000 Imaging system from Fujifilm medical systems.

Laser capture micro-dissection:

Eyes were enucleated from P 17 mice (Normal vs OIR) and flash-frozen in OCT. 12µm sections were cut using a Leica cryostat at -20°C and air-dried for 10 min.

Sections were stained with IsolectinB4 and retinal blood vessels were microdissected using a Zeiss Observer microscope equipped with a Palm MicroBeam device. mRNA was isolated and real time PCRs were performed as described above.

Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) Assay:

The ECIS 9600 system (Applied Biophysics Inc., Troy, NJ, USA) was used to detect and track HUVEC migration, proliferation and survival. Real-time analysis of trans-endothelial electric resistance was performed by plating HUVECs onto 8W10E+ (for proliferation); 8W10E PET (for migration) standard 8-well arrays at a density of 25,000 cells per well (migration) or 5,000 cells per well (proliferation). Cells were allowed to grow to establish a monolayer leading to a capacitance of less than 10nF. Once confluent, cells were starved for 8 hours with endothelial basal media (EBM-2, Lonza) and treated with 25 ng/mL VEGF and 10ng/ml BMP9. Impedance was measured using a ECIS 9600 impedance instrument. Measurements were taken for 100h (proliferation), 12h (survival and migration) post treatment.

Immunohistochemistry:

For retinal staining, P5 pups were enucleated and the eyes were prefixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min at room temperature before dissection. Dissected retinas were embedded in OCT compound before being processed for cryosectioning. Sixteen μ m sections were blocked overnight at 4°C in Tris-HCl 0.1 M-NaCl 150 mM containing 3% Blocking Reagent (Pierce) and 0.5% Triton X-100 (TNBT). Primary antibodies were incubated overnight in TNBT. After washing, the retinas were incubated with IsolectinB4 in Pblec (1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM MnCl₂, 0.1% Triton X-100 in PBS) overnight and incubated with the corresponding secondary antibody (lifetechnology) for 2 h at room temperature, and mounted in fluorescent mounting medium (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Images were acquired on a Olympus Fluoview FV 1000 confocal microscope with the Olympus FV 10-ASW Confocal Imaging System.

For HUVEC immunofluorescence, cells were treated with 10ng/ml BMP9 followed by fixation in 4%PFA for 10min. Primary antibodies were then incubated overnight in TNBT. After washing, cells were incubated with the corresponding secondary antibody for 2 h at room temperature.

Receptor Internalization:

Receptor internalization experiments were done using flow cytometric analysis of cell surface receptor expression. To determine the cell surface expression level of Alk1, cells were treated with 10 ng/ml BMP9 for 30 min. To determine the density of both intracellular and extracellular expression of ALK1, cells were washed with a Perm/Wash buffer containing both 10% FBS and 1% saponin and stained 30 min at 4 °C with anti-ALK1 antibody. A maximum of 10,000 cells were counted using a LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences) at the flow cytometry facility located at the Hopital MaisonneuveRosemont. Relative expression of Alk1 was calculated based on Δ mean fluorescence intensity (Δ MFI of extracellular vs. total ALK1 expression) for each fluorophore (Alexa fluor 568 or FITC) rather than computing the number of fluorescent cells. Two control conditions were always carried out for each series of experiments. For quantification of cell surface expression, flow cytometry data were analyzed using FlowJo software, version 10 (TreeStar, Ashland, OR).

Statistical Analyses:

A two-tailed, unpaired Student's t test was done to determine statistical significance by calculating the probability of difference between two means (Graph- Pad Prism 4; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences were considered statistically significant for p values of 0.05 or less (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005). Error estimates are displayed as SEM.

2.4 Results

Expression of Type II BMP receptors in ECs: We initially sought to determine the expression of type II BMP receptors in ECs. Previous studies have shown that ALK1 can form signaling complexes in response to BMP9 or BMP10 stimulation with 3 type II BMP receptors, BMPRII, ActRIIA and ActRIIB (Townson et al., 2012). As BMP9 has been shown to activate ALK1 signaling in blood vessels of the retina and negatively regulate angiogenesis (Larrivée et al., 2012), we first evaluated the expression of type II BMP receptors in the retinal endothelium. Quantitative PCR analysis of laser-capture microdissected ECs from post-natal (P)7 retinas showed that ALK1 and BMPRII were the BMP9 receptors that showed greater expression in ECs, while ActRIIA, and to a lesser extent, ActRIIB showed only weak expression (Fig. 1A). Immunostaining of P7 retinas confirmed that ALK1 and BMPRII were predominantly expressed in the endothelium (Fig. 1B). ActRIIA and ActRIIB immunofluorescence revealed diffuse staining that was not restricted to the endothelium. The expression of type II BMP receptors was also evaluated in HUVECs by qPCR analysis and showed a trend similar to retinal ECs, characterized by strong expression of BMPRII and ALK1, and lower expression of the Activin receptors (Fig. 1C). Functionally, we were able to confirm by immunoprecipitation that ALK1 form complexes with both BMPRII and ActRIIB in HUVECs following BMP9 stimulation (Fig. 1D). Therefore, subsequent studies focused on the role of BMPRII and ActRIIB in ECs.

BMP9 inhibits the sprouting of ECs in the presence of BMPRII: BMP9 has previously been shown to inhibit sprouting angiogenesis in HUVECs (Kim et al., 2012; Larrivée et al., 2012). To evaluate the relative contribution of type II BMP receptors, we cultured HUVECs in 3D fibrin gels and induced tube formation with VEGF as previously described (Larrivée et al., 2012). HUVECs were transfected with siRNA targeting either *ActRIIB* or *BMPRII*, or control siRNA, before they were

embedded in a fibrin gel. As previously demonstrated, stimulation of cultures with 10ng/ml BMP9 resulted in a potent inhibition of tube formation in HUVECs transfected with control siRNA (Fig. 2A, B). Inhibition of ActRIIB did not prevent the inhibitory effects of BMP9. However, transfection of HUVECs with BMPRII siRNA, significantly blocked the inhibitory effects of BMP9 on endothelial sprouting. These data demonstrate that BMPRII expression is required for the inhibitory effects of BMP9 on endothelial sprouting, but that the expression of ActRIIB is dispensable. The efficiency of siRNA-mediated knockdown of type II BMP receptors was confirmed by qPCR analysis of transfected HUVECs (Fig. 2C).

BMP9 Requires BMPRII for its anti-proliferative and anti-migratory activities:

BMP9 has been shown to be a potent inhibitor of endothelial proliferation and migration (David et al., 2007a, 2008). We examined the potential roles of relevant type II BMP receptors in BMP9 responses in HUVECs. A real-time monitoring technique based on electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) was used to measure cell proliferation and migration (Fig. 3). HUVECs transfected with control or target siRNAs were cultured in ECIS chambers for up to 100 hours in the presence of VEGF with or without 10ng/ml BMP9. We observed that BMP9 caused a significant delay in cell growth in HUVECs transfected with either control or *ActRIIB* siRNA (Fig. 3A). However, the anti-proliferative effects of BMP9 were partially abrogated in the absence of BMPRII. Similarly, we also observed that BMP9 caused a significant inhibition of VEGF-induced migration only in the presence of BMPRII (Fig. 3B). Together, these data highlight the requirement of BMPRII in mediating the anti-proliferative and anti-migratory effects of BMP9 in ECs.

BMPRII is required for BMP9-induced target gene expression: Several studies have shown that stimulation of ECs with BMP9 leads to the expression of Notch target genes (Hey1 and Hey2), the upregulation of endothelial stalk cell and arterial

markers (Jagged1, VEGFR1, EphrinB2) and the downregulation of endothelial tip cell markers such as Apelin (Larrivée et al., 2012). The relative expression of these genes contributes to the proper growth of new blood vessels. To examine the contribution of type II BMP receptors on downstream target genes induced by BMP9, HUVECs transfected with target siRNAs were stimulated with BMP9 for 3 hours, and mRNA was collected and processed for qPCR analysis. As previously demonstrated, we showed that BMP9 stimulation upregulated Hey1, Jagged1, EphrinB2 and Unc5B, and downregulated Apelin mRNA (Fig. 4). Transfection with *ActRIIB* siRNA did not significantly modulate the effects of BMP9, but *BMPRII* knockdown did abrogate the effects of BMP9 on gene expression. Taken together, these data show that *BMPRII* expression is required for BMP9-ALK1 downstream activation of target gene expression.

BMPRII is required for BMP9-induced ALK1 internalization and downstream Smad signaling: BMP9 stimulation of HUVECs induces rapid phosphorylation of SMAD1,5,9, but has also been shown to activate non-Smad signaling such as Erk1,2, Akt and JNK (Cai et al., 2012). While BMP-mediated Smad signaling has been shown to play a role in EC tip/Stalk cell specification (Larrivée et al., 2012), the role of BMP-mediated non-Smad signaling in ECs is still unclear. As we have shown that *BMPRII* is essential for the anti-angiogenic activities of BMP9 in ECs, we evaluated its contribution in the propagation of BMP9 signaling. siRNA-transfected HUVECs were starved overnight in 0.5%FBS, followed by stimulation with BMP9 for 15 min. BMP9 stimulation of HUVECs induced phosphorylation of Smad1,5,9 and Erk1,2, but did not significantly induce Akt phosphorylation (Fig. 5). Smad1,5,9 phosphorylation was *BMPRII*-dependent, as shown by siRNA-mediated knockdown of *BMPRII*, which significantly reduced BMP9-mediated Smad phosphorylation. However, the activin receptors *ActRIIA* and *ActRIIB* appeared to be dispensable for BMP9-mediated Smad signaling, as no changes in Smad1,5,9 phosphorylation were observed in their absence. Interestingly, HUVECs transfected with *BMPRII* siRNA

exhibited stronger Erk1,2 and Akt phosphorylation in response to BMP9, while ActRIIB siRNA-transfected cells showed decreased Erk1,2 phosphorylation. These data show a requirement for BMPRII for the propagation of Smad signaling, but also suggest that BMPRII is dispensable for BMP9-mediated non-Smad signaling in ECs.

BMP signaling is regulated by receptor oligomerization and membrane localization and its subsequent intracellular signal propagation is controlled by endocytosis of the receptor complex (Ehrlich, 2016). As our data clearly show that BMPRII is required for the activation of Smad1,5,9 signaling by BMP9, we evaluated whether BMPRII controlled the internalization of ALK1 following BMP9 stimulation. The stimulation of ALK1 with BMP9 triggered the internalization of ALK1, which led to pronounced clustering and endocytosis of surface receptor (Fig. 6A). While loss of ActRIIB did not significantly affect ALK1 clustering and internalization following BMP9 stimulation, knockdown of BMPRII appeared to block internalization of ALK1. These observations were confirmed by flow cytometry analysis, which showed a significant reduction in cell surface localization of ALK1 in BMP9-treated HUVECs stimulated with BMP9. While BMP9-induced internalization was still present in *ActRIIB* siRNA-transfected HUVECs, loss of BMPRII significantly impaired ALK1 internalization triggered by BMP9 (Fig. 6B, C). Together, these data show a critical role for BMPRII in ALK1 internalization following BMP9 stimulation. Lack of receptor complex internalization in BMPRII-deficient cells may account for reduced Smad signaling. Indeed, we showed that HUVECs treated with dynasore, an inhibitor of dynamin-dependent endocytosis (Macia et al., 2006), showed significantly reduced Smad1,5,9 phosphorylation in response to BMP9 (Fig. 6D). These results indicate that inhibition of dynamin-dependent endocytosis of the ALK1/BMPRII receptor complex affects Smad phosphorylation. Lack of BMPRII would result in impaired receptor complex internalization in ECs in response to BMP9, leading to decreased Smad phosphorylation and loss of its effects on angiogenesis and vascular remodeling.

2.5 Discussion

The cellular effects of BMP9/ALK1 signaling in endothelial cells are controversial. Multiple reports have shown conflicting data with regards to its effects on angiogenesis. For example, in immortalized mouse embryonic endothelial cells, a constitutively active form of ALK1 (ALK1ca) increases migration and proliferation of ECs (Goumans et al., 2002, 2003). Similarly, another study shows that BMP9 induces the proliferation of several endothelial cell lines (Suzuki et al., 2010). However, other reports show that ALK1ca expression inhibits EC proliferation but has no effect on capillary tube formation (Ota et al., 2002). Furthermore, a study in Human Microvascular Endothelial cells also found that expression of ALK1ca inhibits proliferation and migration (Lamouille et al., 2002) and that ALK1 down-regulation accelerates EC migration. Finally, several studies have shown that treatment of multiple endothelial cell lines with BMP9 inhibits sprouting, migration and proliferation (David et al., 2007a, 2008; Larrivée et al., 2012; Scharpfenecker et al., 2007). These differences could be due to the differences in expression of factors modulating BMP signaling and may account for the apparent discrepancies in ALK1 signaling activities.

In the present work, we demonstrate that the complexes that ALK1 forms with type II BMP receptors can directly modulate downstream signaling events and affect the BMP9 biological responses in ECs. Because ALK1-specific ligands have not been recognized until recently, we still do not completely understand which type II BMP receptors partner with ALK1 to form a functional signaling complex in ECs. Three different type II BMP receptors, BMPRII, ActRIIA, and ActRIIB, have been suggested for BMP9 signaling, and thus indirectly implicated in ALK1 signaling, but their respective contributions to BMP9 signaling are unclear. We show here that the predominant type II receptor expressed in two endothelial cell types in which BMP9 has previously been shown to have anti-angiogenic activities is BMPRII (Larrivée et

al., 2012). In HUVECs, stimulation of BMP9 leads to rapid receptor complex formation and internalization of ALK1/BMPRII, leading to Smad1,5,9 phosphorylation and modulation of the expression of downstream target genes which play a role in the switch between endothelial tip/stalk cell specification. These signaling events lead to the inhibition of EC sprouting, proliferation and migration. In the context of BMPRII knockdown, it appears that the other two BMP9 type II receptors cannot compensate for the loss of BMPRII. These data therefore suggest that the relative expression of type II BMP receptors may modulate the fine balance of cellular events triggered by BMP9 in ECs.

Accordingly, we observed that while Smad signaling was impaired in BMPRII-deficient cells, non-Smad signaling such as Erk1,2 and Akt was enhanced. Similarly, while Smad signaling was not affected in the absence of ActRIIB, we observed a small but significant reduction of Erk1,2 phosphorylation in ECs lacking this receptor. These data suggest that the relative levels of type II BMP receptors may fine-tune the balance between Smad and non-Smad signaling in ECs. Although the Smad pathway is best characterized downstream of BMP9, it is increasingly apparent that it can activate other signaling pathways (Derynck and Zhang, 2003). Previous studies have shown that ALK1 signaling triggers p38, JNK, Erk1,2 and Akt signaling in ECs (David et al., 2007b) but the implications of these molecular events in mediating the biological effects of BMP9 are still unresolved. For example, it has been suggested that the inhibition of EC migration induced by ALK1 signaling is independent of Smad signaling, but would instead be a consequence of inappropriate Erk1,2 signaling (David et al., 2007b). Therefore, the increased EC migration resulting from BMPRII inhibition may be a consequence of increased Erk1,2 activation, as opposed to the reduction of Smad signaling. Taken together, these data clearly suggest that changes in relative levels of type II BMP receptors in ECs can lead to significant changes in downstream signaling events and may allow BMP9 to switch from a predominantly Smad response in the presence of high levels of

BMPRII, to a predominantly non-smad response in cells with low BMPRII.

Our study therefore allows us to propose a model, in which the anti-angiogenic effects of BMP9 would require the internalization of a ALK1/BMPRII receptor complex, which would lead to Smad signaling and the modulation of the expression of genes involved in tip/stalk cell specification. However, in ECs displaying low levels of BMPRII, BMP9-induced receptor complex internalization would be reduced and lead to predominantly non-smad signaling. According to this model, type II BMP receptors would therefore be critical regulators of the BMP9 response in ECs.

2.6 Acknowledgments:

The work described in this paper was supported by the Foundation Fighting Blindness, The Vision Health Research Network of the FRQS and Hopital Maisonneuve-Rosemont Foundation. B.L. was supported by a New Investigator Award from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

2.7 References:

Cai, J., Pardali, E., Sánchez-Duffhues, G., and ten Dijke, P. (2012). BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett.* *586*, 1993–2002.

David, L., Mallet, C., Vailhé, B., Lamouille, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007b). Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J. Cell. Physiol.* *213*, 484–489.

David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007a). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* *109*, 1953–1961.

David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2008). Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.* *102*, 914–922.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* *425*, 577–584.

Ehrlich, M. (2016). Endocytosis and trafficking of BMP receptors: Regulatory mechanisms for fine-tuning the signaling response in different cellular contexts. *Cytokine Growth Factor Rev.* *27*, 35–42.

Goumans, M.-J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., and ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* *21*, 1743–1753.

Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S., and ten Dijke, P. (2003). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol. Cell* *12*, 817–828.

Kim, J.-H., Peacock, M.R., George, S.C., and Hughes, C.C.W. (2012). BMP9 induces EphrinB2 expression in endothelial cells through an Alk1-BMPRII/ActRII-ID1/ID3-dependent pathway: implications for hereditary hemorrhagic telangiectasia type II. *Angiogenesis* *15*, 497–509.

Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2002). Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* *100*, 4495–4501.

Larrivée, B., Prahst, C., Gordon, E., del Toro, R., Mathivet, T., Duarte, A., Simons, M., and Eichmann, A. (2012). ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev. Cell* 22, 489–500.

Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* 10, 839–850.

Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H., and Miyazono, K. (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 193, 299–318.

Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R.L., Zhao, Q., Pukac, L., Löwik, C.W.G.M., and ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J. Cell Sci.* 120, 964–972.

Suzuki, Y., Ohga, N., Morishita, Y., Hida, K., Miyazono, K., and Watabe, T. (2010). BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 123, 1684–1692.

Townson, S.A., Martinez-Hackert, E., Greppi, C., Lowden, P., Sako, D., Liu, J., Ucran, J.A., Liharska, K., Underwood, K.W., Seehra, J., et al. (2012). Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J. Biol. Chem.* 287, 27313–27325.

2.8 Figure Legends

Figure-2.1. Expression of type II BMP receptors in ECs. (A) P7 retinas were cryosectioned, stained with fluorescently labeled-isolectinB4 and isolectinB4-positive tissue was harvested by laser capture microdissection. mRNA was harvested from collected samples and processed for quantitative PCR analysis. Expression analysis showed significant expression of *ALK1* and *BMPRII*, with *ActRIIA* and *ActRIIB* being expressed at lower levels (n=3 animals). (B) Immunofluorescent staining was performed on cryosections of P7 retinas, and fluorescently labeled isolectin was used to counterstain the entire vasculature. Staining of retinas confirmed the expression of ALK1 and BMPRII in the endothelium. Scale bar represents 75 μ m. (C) Quantitative PCR analysis of mRNA harvested from HUVECs show strong expression of ALK1 and BMPRII and low expression of ActRIIA and ActRIIB (n= 3 repeats). (D) Association of BMPRII and ActRIIB with ALK1 in response to BMP9 (10 ng/ml) for 15 minutes. HUVEC protein extracts were immunoprecipitated with an ALK1 antibody, incubated with protein G-Sepharose beads and analyzed by immunoblotting as indicated. Image shown is a representative blot of an experiment performed 4 times.

Figure-2.2. Contribution of type II BMP receptors to Endothelial Sprouting *In Vitro*. (A) Representative images of siRNA-transfected HUVECs sprouting in a fibrin gel in the presence or absence of BMP9. Scale bar, 75 μ m. (B) Quantification of tube surface area. Graphs represent the average of eight experiments. (C) Quantitative PCR analysis of siRNA transfected HUVECs confirmed the knockdown of target genes. All values are mean \pm SEM. *p < 0.05; Student's t test.

Figure-2.3. BMP9 inhibits endothelial proliferation and migration in the presence of BMPRII. BMP9 inhibition of endothelial proliferation *in vitro*. (A) Effect of type II BMP receptors on HUVEC proliferation in the presence or absence of BMP9.

HUVECs at a density of 2,000 cells/well in 8W10E+ Plates in the presence of VEGF or VEGF + BMP9 were followed during 100 hours using the ECIS system. (B) Effect of type II BMP receptors on HUVEC migration in the presence or absence of BMP9. Cell migration data were collected in 8W10E PET ECIS chambers after a small wound was performed in a HUVEC monolayer using a high current pulse. Closure of the wound was monitored for 12 hours. Results from 1 representative experiment performed four (proliferation) or three (migration) times are presented as cell index different times after plating. Cell Index is derived as a relative change in measured electrical impedance to represent cell status and is directly proportional to cell number.

Figure-2.4. BMP9 signaling requires BMPRII to modulate endothelial gene expression. qPCR analysis of genes involved in Notch signaling or endothelial tip/stalk cell specification in siRNA-transfected HUVECs after 3 hr stimulation with BMP9. Graphs represent the average of three to five experiments. All values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; Student's t test.

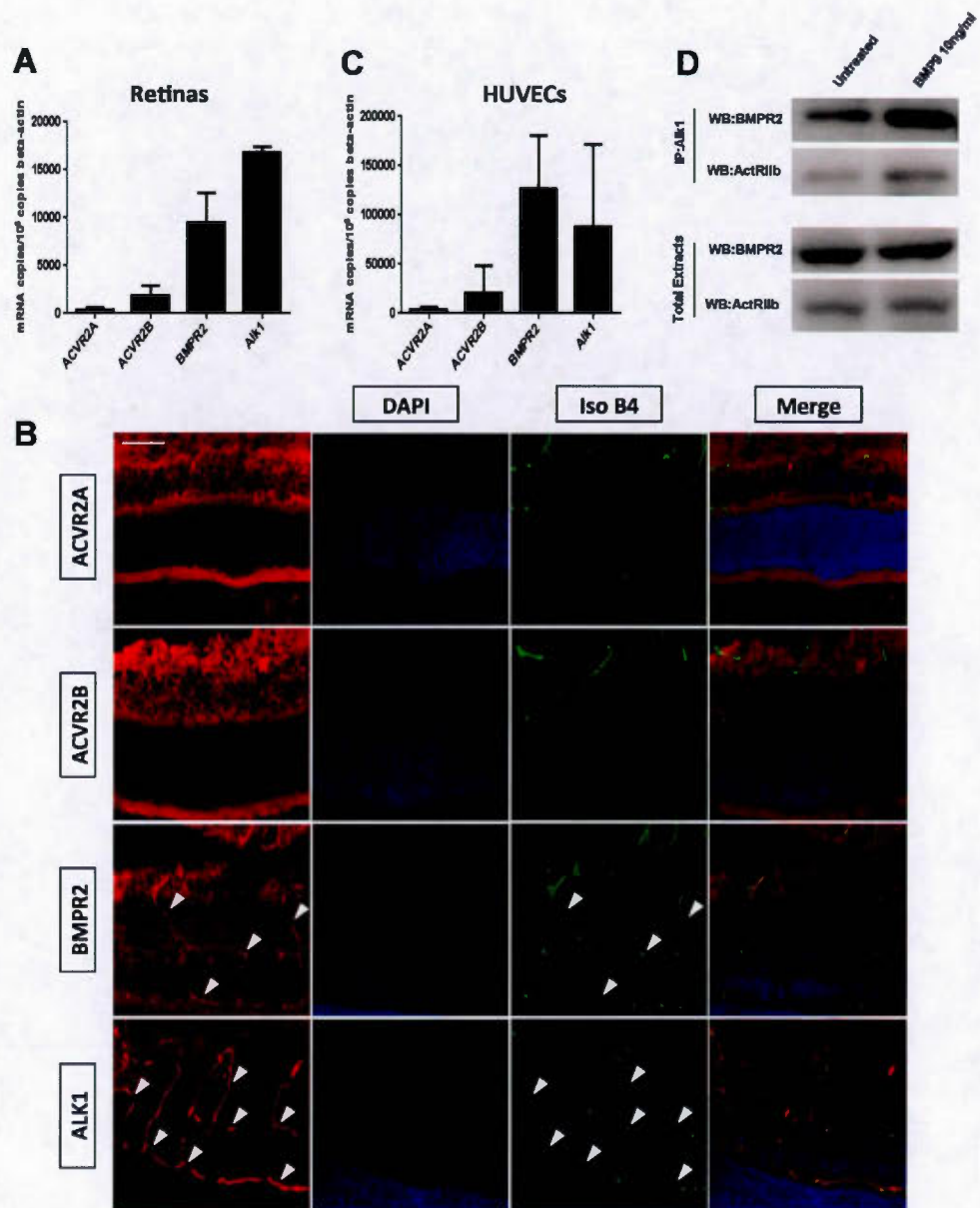
Figure-2.5. Requirement of type II BMP receptors for BMP9 signaling in HUVECs. (A) Western blot analysis of control or target siRNA-transfected HUVECs following stimulation with 10 ng/ml BMP9 for 15 min. (B) Quantification of band intensity was performed by densitometric analysis. Graphs represent the average of three to five experiments. All values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; Student's t test.

Figure-2.6. BMPRII regulates ALK1 internalization following BMP9 stimulation. (A) HUVECs transfected with siRNA were stimulated with 10 ng/ml BMP9 and stained with a CD31 (green) and ALK1 antibodies (red). (Scale bar represents 75 μ m). (B) Flow cytometry analysis of siRNA-transfected HUVECs showing ALK1 fluorescence following before and after BMP9 stimulation in permeabilized and non-permeabilized cells. (C) Quantification of ALK1 relative fluorescence in

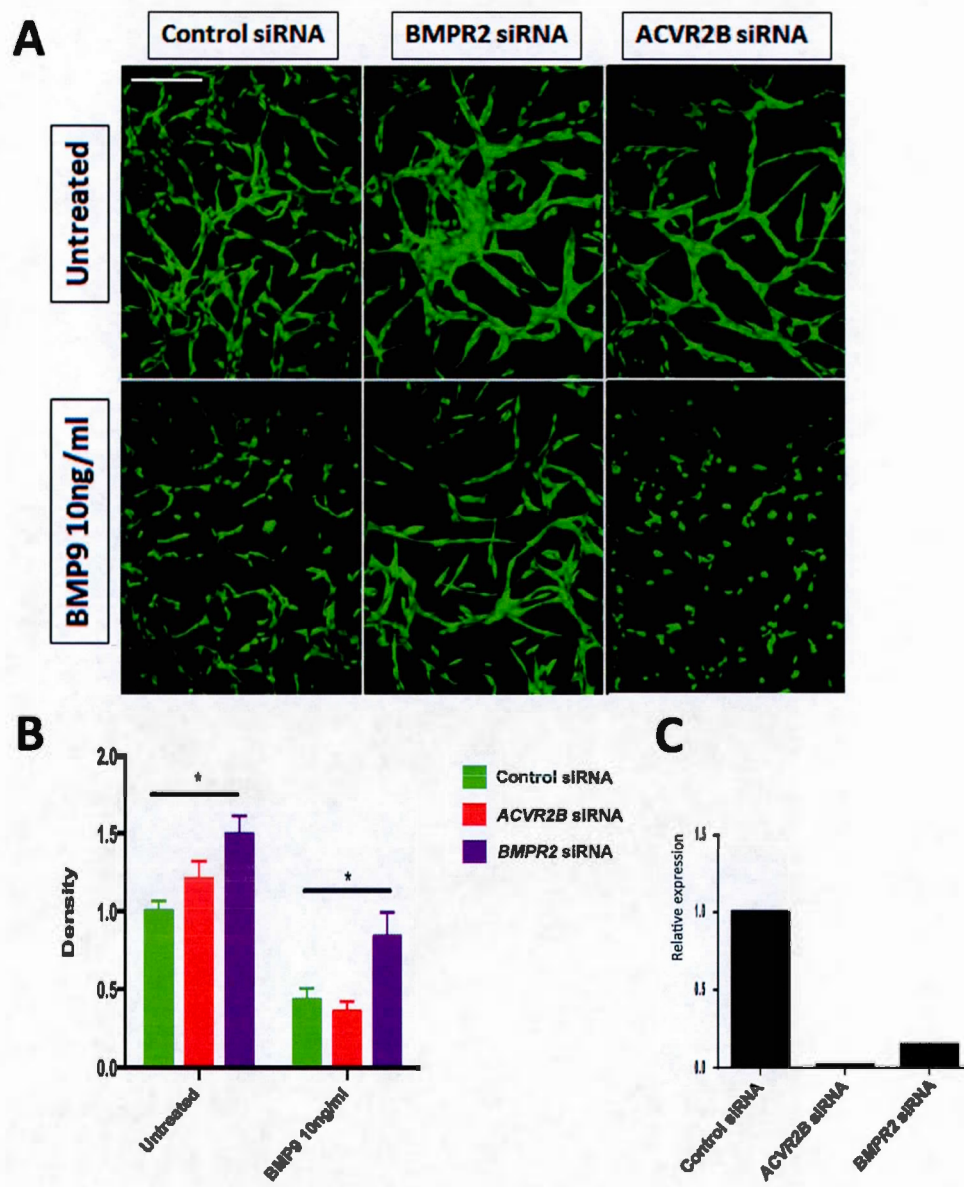
permeabilized and non-permeabilized HUVECs following BMP9 stimulation. (D) Serum starved HUVECs were treated for 2 h with 40 μ M dynasore or 0.05% DMSO and incubated for 15 min at 37°C with BMP9. Smad1,5,9 phosphorylation was monitored by western blot. Graphs represent the average of three experiments. All values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; Student's t test.

Figure-2.7. Working Model for BMP9/ALK1/BMPRII Signaling in ECs.

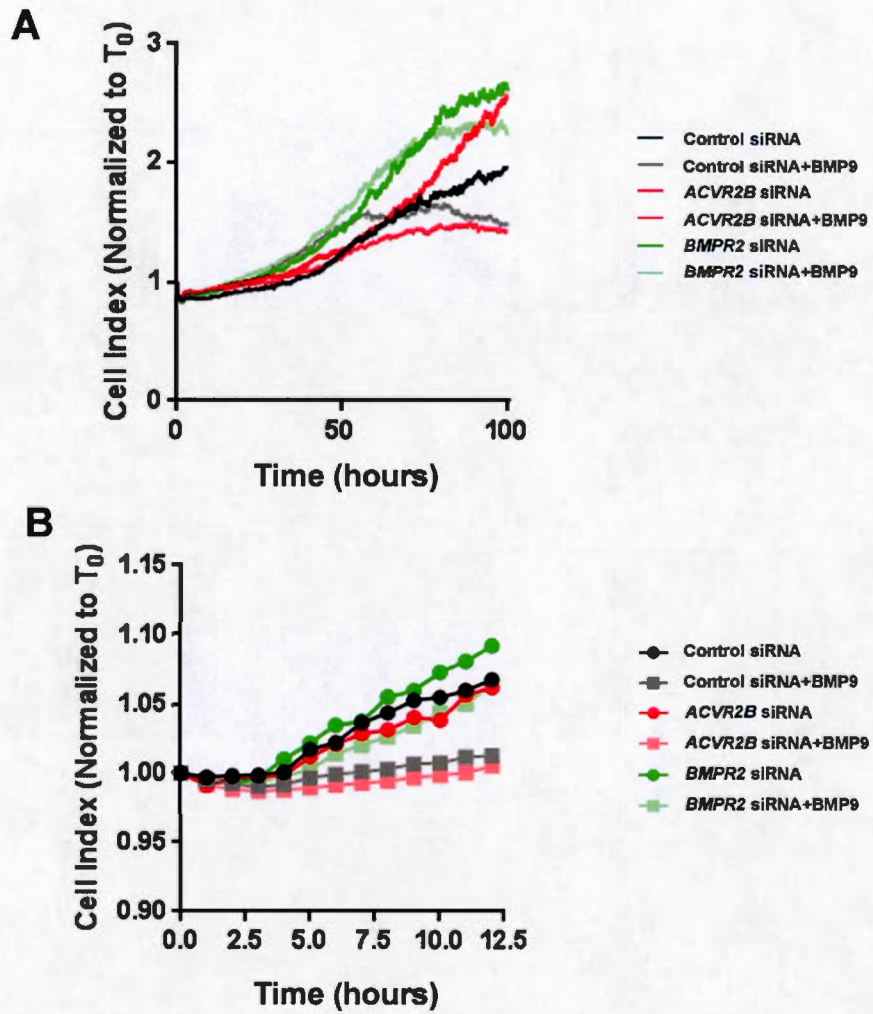
The data suggest that BMP9 binding triggers the association of ALK1 and BMPRII, which is required for receptor complex internalization and activation of downstream Smad signaling, which in turns regulate gene expression and vascular quiescence.



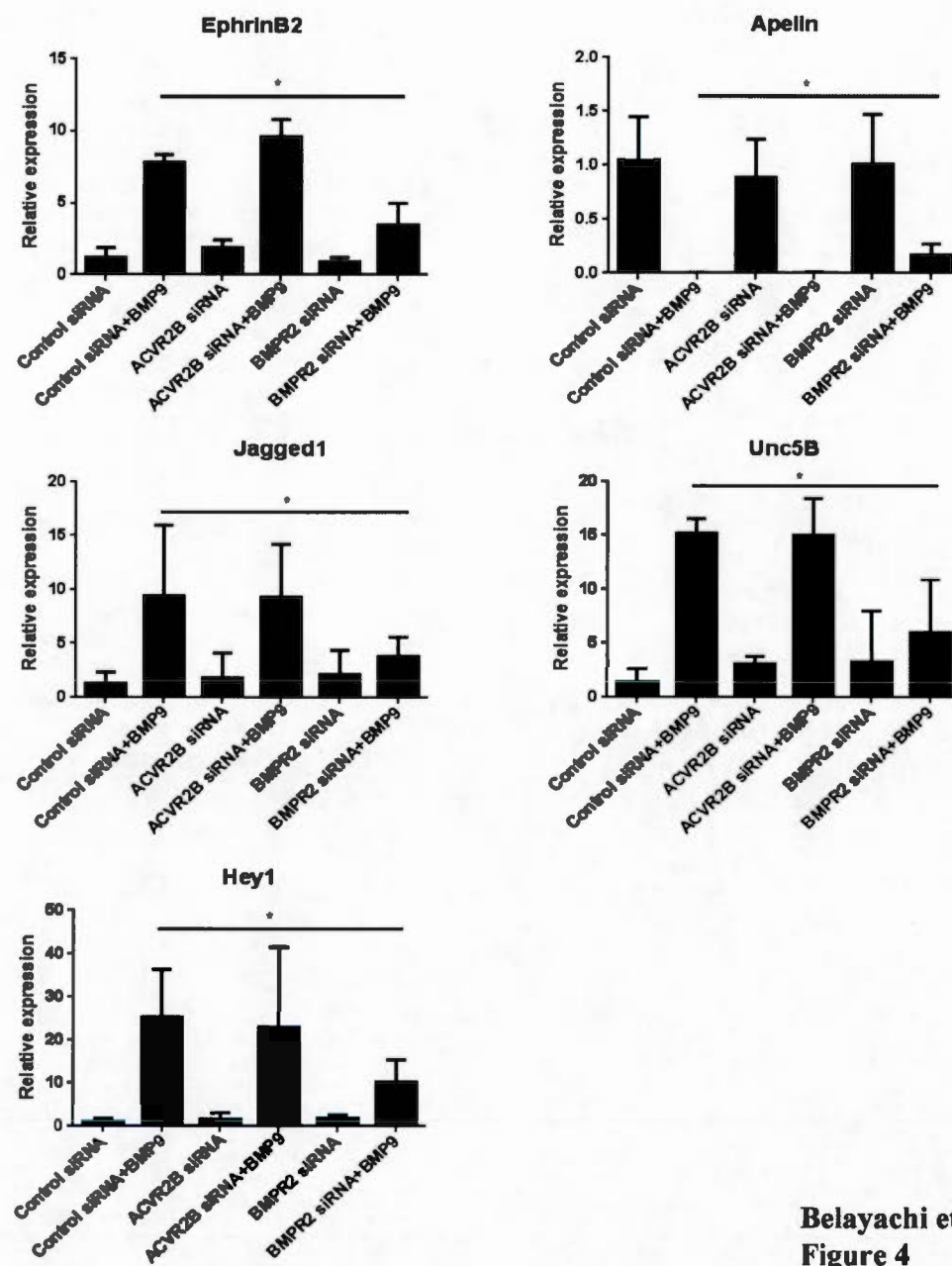
Belayachi et al.
Figure 1



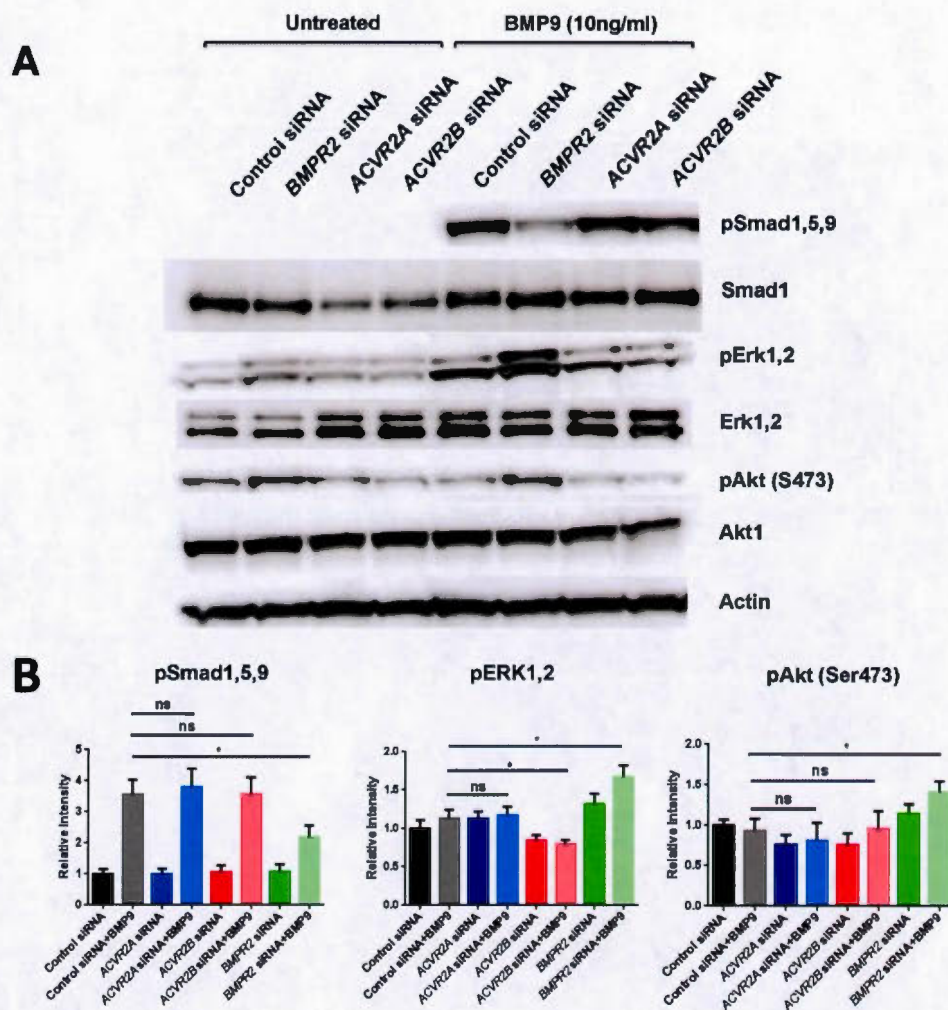
Belayachi et al.
Figure 2



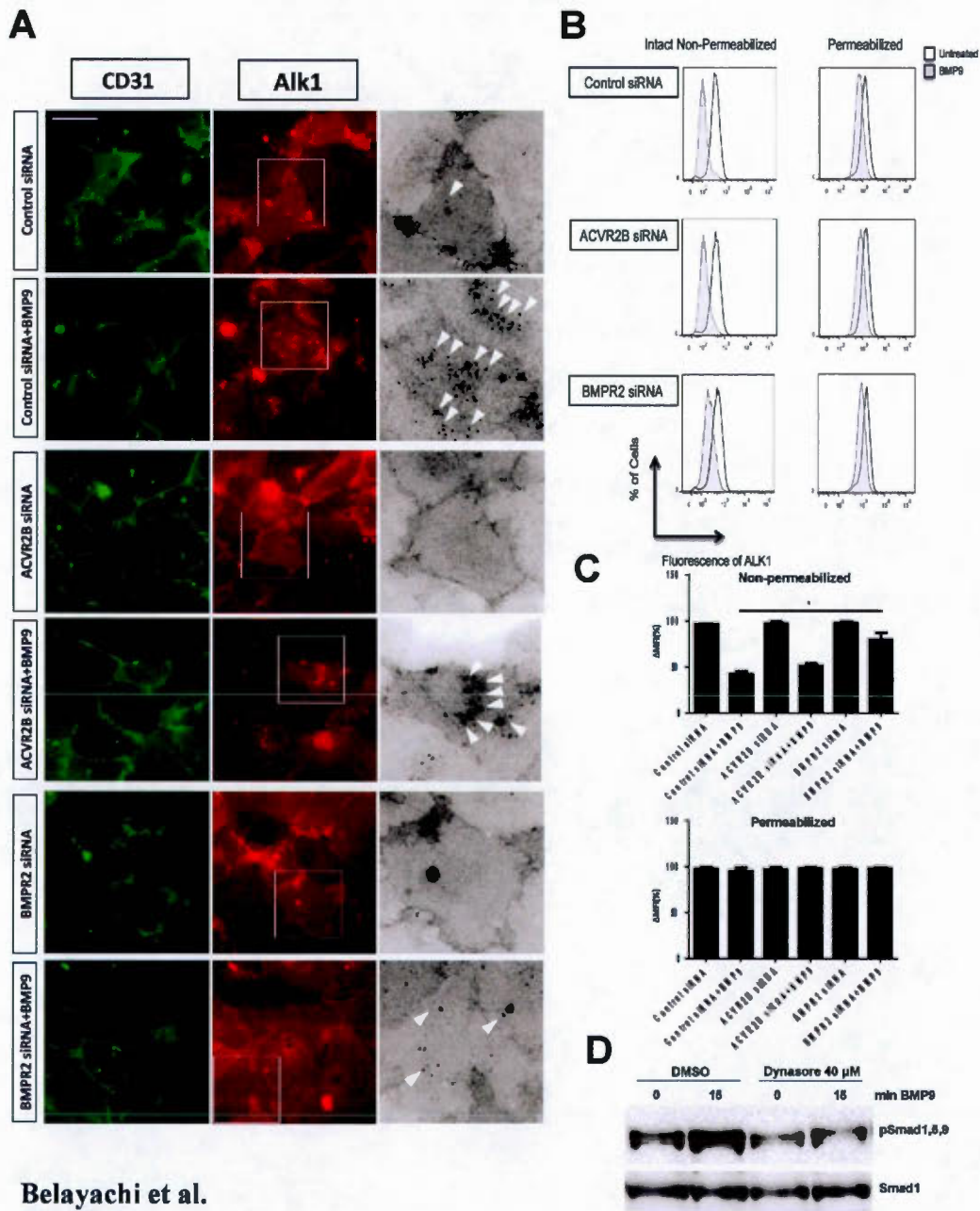
Belayachi et al.
Figure 3



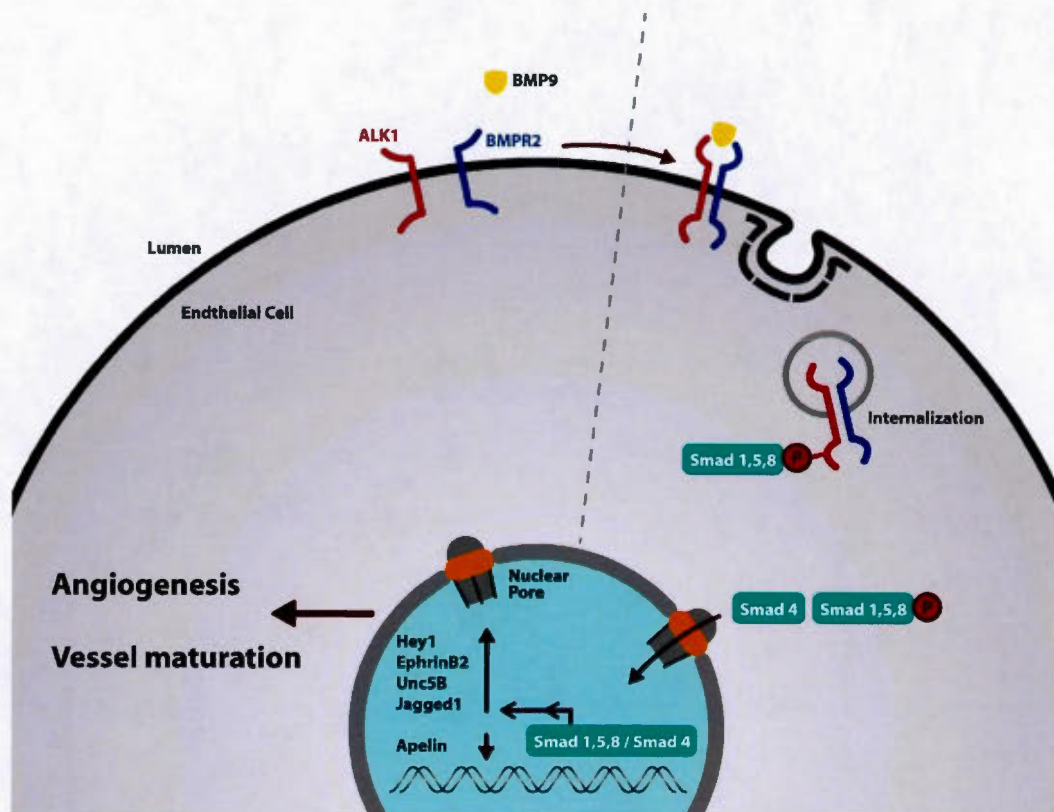
Belayachi et al.
Figure 4



**Belayachi et al.
Figure 5**



Belayachi et al.
Figure 6



**Belayachi et al.
Figure 7**

CHAPITRE III

DISCUSSION

ALK1 est un important régulateur de la formation des vaisseaux sanguins, mais est également impliqué dans la croissance vasculaire anormale dans plusieurs pathologies (Cunha et al., 2011). Une inactivation du gène codant pour ALK1 (*ACVRL1*) dans un modèle murin conduit à une létalité embryonnaire précoce à E11.5, induite par des défauts dans le remodelage du plexus capillaire primaire en un réseau fonctionnel d'artères, de capillaires et de veines (Urness 2000). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré le double effet pro- et anti-angiogénique de la liaison du récepteur ALK1 à son ligand BMP9 (Larrivée et al 2012, Suzuki et al 2010). L'étude que nous présentons ici tente de comprendre les implications moléculaires de ce double effet, et plus particulièrement le rôle de récepteur BMPRII dans l'orientation d'un switch anti-angiogénique après leur liaison avec ALK1.

Nous avons dans cette étude comparée l'expression des récepteurs de type II entre deux types cellulaires exprimant un effet anti- et pro- angiogénique en réponse au BMP9. Le traitement au BMP9 de cellules endothéliales humaines ombilicales (HUVEC) permet d'observer un effet anti-angiogénique, alors que dans les cellules lymphatiques le résultat contraire a été observé (Figure 3.1). Les quantifications par qPCR ont permis de mettre en évidence la différence d'expression des récepteurs de type II dans ces deux types cellulaires. L'implication des récepteurs ActRIIB et BMPRII dans cette réponse contraire semble donc résulter de leur expression cellulaire différentielle (Figure-3.2). Les données in vivo corroborent parfaitement les résultats que nous avons obtenu in vitro : la rétine présente en effet

des niveaux importants du récepteur BMPRII, en réponse desquelles un traitement au BMP9 par injection intravitréale induit un effet anti-angiogénique prononcé. (Larrivée et al., 2012). Nous nous sommes donc par la suite penchés sur les mécanismes par lequel ce récepteur médie les effets anti-angiogéniques de la BMP9.

L'implication des récepteurs aux BMP de type II sur la formation des vaisseaux sanguins a été mise en évidence in vitro sur un modèle de sprouting (Larrivée et al., 2012). La diminution d'expression de BMPRII (par diminution de l'expression du BMPRII via un siRNA) entraînait une augmentation de tubes par rapport au contrôle, ainsi que la perte de l'effet du BMP9 sur les cellules traitées avec BMPRII siRNA. L'ensemble de ces données suggèrent que le BMPRII contribue dans l'effet anti-angiogénique, résultat corroboré par les travaux de David et al dans lesquels la BMP9 montre un effet anti-angiogénique sur les CE (David et al., 2007a). La diminution de l'expression de ActRIIB par siRNA n'a de façon assez surprenante conduit à aucun effet significatif sur le sprouting.

Plusieurs expériences de prolifération cellulaire ont été réalisées afin de corroborer le concept anti/pro-angiogénique. Dans un système permettant de corréler la résistance électrique du système à la prolifération cellulaire (ECIS), nos résultats ont démontré que la perte de BMPRII favorise la prolifération cellulaire, ainsi que l'inhibition de l'effet antiprolifératif du BMP9. Cette dernière donnée confirme que le récepteur BMPRII contribue dans l'effet antiprolifératif du BMP9 (David et al., 2007b). Concernant ActRIIB, l'absence d'effet significatif après diminution d'expression du récepteur pourrait s'expliquer, comme dans notre modèle de sprouting, par sa faible concentration dans les HUVEC et sa possible redondance avec ActRIIA.

Nous avons grâce au même système testé la migration des CE. Tout comme au niveau de la prolifération cellulaire, nos résultats ont montré que le silencing du BMPRII inhibait l'effet du BMP9 et favorisait la migration cellulaire.

Plusieurs études cristallographiques ont montré qu'en présence du ligand BMP, un complexe composé de récepteurs de type I et des récepteurs de type II se formait (Greenwald et al., 2003; Townson et al., 2012). En accord avec ces données, nos travaux ont également démontré par immunoprécipitation que BMPRII et ActRIIB se lient à ALK1 en présence de BMP9, résultats également corroborés par Townson et al (Townson et al., 2012).

L'internalisation de ALK1 correspond à une étape clé de sa signalisation (Rudini et al., 2008). Nous avons de ce fait voulu étudier l'effet de ces récepteurs sur l'internalisation de ALK1. Nos résultats ont ainsi permis de mettre en évidence que la perte de BMPRII inhibe l'internalisation de ALK1, ce qui indique que BMPRII présente davantage d'affinité pour ALK1 en présence de BMP9. L'internalisation en question a été mesurée par cytométrie de flux, confirmant que BMPRII est nécessaire à l'internalisation de ALK1.

La BMP9 est par ailleurs un activateur canonique de la voie Smad par l'intermédiaire de ALK1 (Larrivée et al., 2012). Nos résultats ont permis de démontrer que la perte de BMPRII induisait une diminution d'activation de la voie smad, indiquant donc que BMPRII est directement impliqué dans la signalisation de smad. Nos résultats rejoins une étude où la surexpression de BMPRII active la signalisation de la voie Smad (Amsalem et al., 2016). Cette dernière donnée fait directement suite aux données montrant que BMPRII induisait l'internalisation de ALK1, ayant pour effet l'activation de la voie smad 1,5,8. Aussi, nos résultats sont consistants avec la littérature, suggérant que BMPRII régule la signalisation des récepteurs de type I par endocytose (Amsalem et al., 2016).

De la même façon, les cellules traitées avec BMPRII siRNA présentent un défaut au niveau de l'activation de la signalisation de la voie Smad, alors qu'au contraire les voies Erk1, 2 et Akt sont activées. Il est également important de mentionner que même si la voie Smad n'est pas affectée par l'absence d'ActRIIB, une réduction significative de l'activation des voies Erk1 et 2 a pu être mise en évidence dans les CE traitées par le ActRIIB siRNA. L'ensemble de ces données permet d'avancer que les niveaux d'expression du récepteur BMPRII semblent finement réguler la voie Smad et les voies Smad-indépendantes au niveau des CE. Dans ce même type cellulaire, la voie Smad n'est toutefois pas uniquement consécutive à l'action de la BMP9, mais semble également pouvoir activer d'autres voies de signalisation telles que p38, JNK, Erk 1 et 2, ainsi que AKT (David et al., 2007b). La signification biologique de ces cascades d'activation secondaires à la liaison du BMP9 n'est toutefois pas encore comprise. Certaines pistes semblent toutefois confirmer que l'inhibition de la migration des cellules endothéliales induite par ALK1 n'est pas due à la signalisation Smad, mais davantage à un dérèglement des voies Erk 1 et 2 (David et al., 2007b). De ce fait, nous pouvons ainsi comprendre que le phénomène contraire, à savoir l'augmentation de la migration endothéliale en réponse à l'inhibition du BMPRII est due à une activation des voies Erk 1 et 2. Ces résultats suggèrent qu'un changement de concentration des récepteurs aux BMP de type II est susceptible de moduler les voies de signalisation secondaires et pourrait permettre au BMP9 de basculer d'un phénotype Smad-dépendant en présence de BMPRII à un phénotype Smad-indépendant lorsque ces niveaux décroissent.

Notre étude nous permet donc de proposer un modèle, dans lequel les effets anti-angiogéniques de la BMP9 exigeraient l'internalisation d'un complexe de récepteurs BMPRII/ALK1, ce qui conduirait à la signalisation de la voie Smad et la

modulation de l'expression des gènes impliqués dans la spécification pointe / tige des cellules endothéliales.

Il est toutefois nécessaire d'apporter ici une critique réaliste des données obtenues. Plusieurs expériences, de par leur design ou simplement par les résultats obtenus, présentent certaines carences que des expériences complémentaires devront corriger. La surexpression des récepteurs BMPRII et ActRIIB fait partie de ces points faibles.

L'autre faiblesse de l'étude se situe au niveau de l'effet pro-angiogénique du BMP9, qui n'a pu être mis en évidence dans les HUVEC, probablement en raison des niveaux élevés de récepteurs BMPRII. L'utilisation d'une autre lignée cellulaire n'exprimant que peu de BMPRII, telle qu'une lignée de cellules lymphatiques qui au contraire présentant des concentrations d'ActRIIB plus conséquentes pour un niveau faible de BMPRII aurait pu palier à ce problème et devra être envisagée pour la suite du projet.

Cette étude pourrait être une plateforme pour la compréhension du mécanisme d'action de BMP9 sur les CE. De plus, elle pourrait aider à comprendre les mécanismes de certaines pathologies comme l'hypertension pulmonaire, dont la principale cause est une mutation du gène *bmpr2*. Enfin, ces résultats pourront aider à diriger les recherches qui se focalisent sur le récepteur ALK1 comme nouvelle cible thérapeutique en angiogenèse.

Perspectives

Les résultats présentés dans ce manuscrit indiquent que le récepteur BMPRII contribue majoritairement dans l'effet anti-angiogénique du BMP9 sur les CE. Ces données représentent aujourd'hui une étape fondamentale dans la compréhension des mécanismes anti-angiogéniques.

L'importance d'un mécanisme mis en évidence *in vitro* ne peut toutefois véritablement se mesurer qu'au travers son implication au sein d'un système physiologique complexe. Une translation vers un modèle *in vivo* reste de ce fait nécessaire aujourd'hui afin de corroborer les travaux accomplis, et devrait être effectué.

Le choix du modèle animal adéquat. L'un des modèles d'angiogenèse par excellence est le modèle de développement vasculaire rétinien murin. L'utilisation commune et relativement peu coûteuse, l'utilisation d'un modèle murin permet la génération de données rapides couplée à un pouvoir statistique important. Considéré comme le tissu métaboliquement le plus actif de l'organisme, la rétine de la souris présente le grand avantage d'offrir un modèle de développement vasculaire complet en l'espace de 21 jours. L'absence de macula n'est que peu préjudiciable ici, puisque le développement vasculaire reste globalement similaire au développement vasculaire de la rétine humaine. Il est également important de spécifier que le montage à plat (Flatmount) des rétines extraites permet de très simplement mesurer l'état du développement vasculaire. L'étude de l'implication du BMPRII sur la formation des plexus vasculaires rétiniens serait donc tout à fait envisageable au travers le développement de la vasculature rétinienne.

Pour se faire, un *ko* systémique du gène *bmpr2*, inductible par système Cre Lox (tamoxifen inductible) permettrait de montrer la régulation du développement vasculaire en condition *ko*. Cet animal génétiquement modifié présente une possibilité, mais il ne faut toutefois pas exclure l'impact de l'absence du

récepteur BMPRII au niveau des types cellulaires autres que les cellules constituant l'endothélium vasculaire.

ANNEXES
FIGURES SUPPLIMENTAIRES

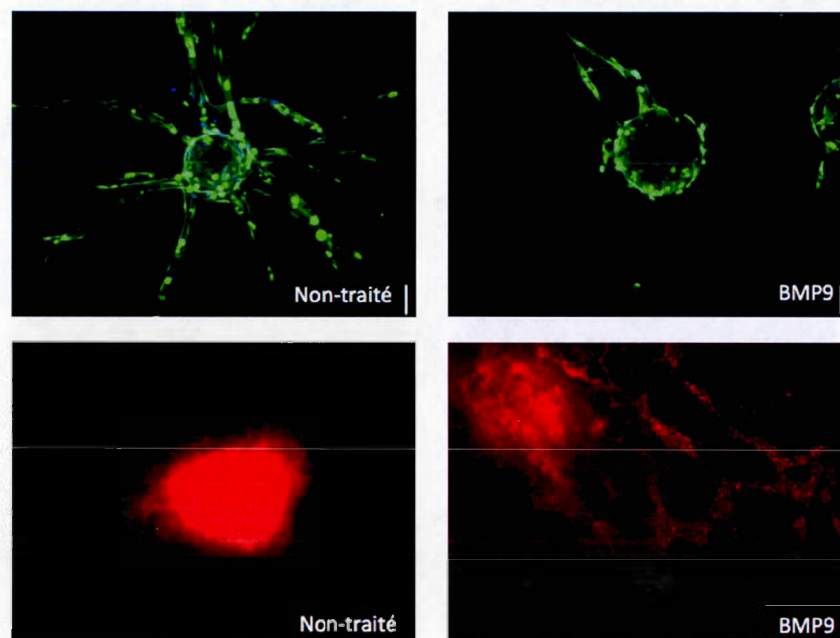


Figure 3.1: le double effet du BMP9 sur différents types de CE.
1ere ligne HUVEC en culture sans et avec BMP9 : effet anti-angigénique.
2eme ligne cellules lymphatiques en culture sans et avec BMP9 : effet pro-angigénique.

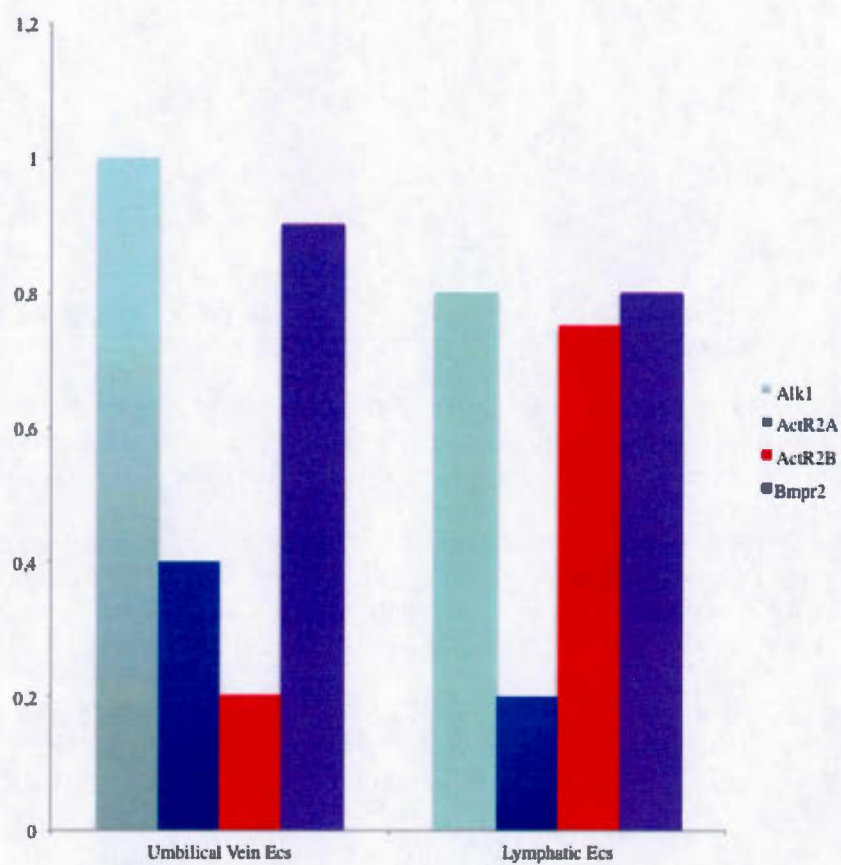


Figure 3.2: qPCR comparative entre l'expression des récepteurs de type II aux BMP chez les HUVEC et Les cellules Lymphatiques.

RÉFÉRENCES

Adams, R.H., and Eichmann, A. (2010). Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001875.

Alden, T.D., Beres, E.J., Laurent, J.S., Engh, J.A., Das, S., London, S.D., Jane, J.A., Hudson, S.B., and Helm, G.A. (2000). The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair. *J. Craniofac. Surg.* 11, 24–30.

Amsalem, A.R., Marom, B., Shapira, K.E., Hirschhorn, T., Preisler, L., Paarmann, P., Knaus, P., Henis, Y.I., and Ehrlich, M. (2016). Differential regulation of translation and endocytosis of alternatively spliced forms of the type II bone morphogenetic protein (BMP) receptor. *Mol. Biol. Cell* 27, 716–730.

Aprelikova, O., Pajusola, K., Partanen, J., Armstrong, E., Alitalo, R., Bailey, S.K., McMahon, J., Wasmuth, J., Huebner, K., and Alitalo, K. (1992). FLT4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter. *Cancer Res.* 52, 746–748.

Arroyo, A.G., and Iruela-Arispe, M.L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc. Res.* 86, 226–235.

Attisano, L., Cárcamo, J., Ventura, F., Weis, F.M., Massagué, J., and Wrana, J.L. (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75, 671–680.

Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 165–177.

Balemans, W., and Van Hul, W. (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.* 250, 231–250.

Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., and Adams, R.H. (2009). The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137, 1124–1135.

Benezra, R., Rafii, S., and Lyden, D. (2001). The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene* 20, 8334–8341.

Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., and Keshet, E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest.* 103, 159–165.

Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., and Moses, H.L. (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 12, 27–36.

Bilandzic, M., Chu, S., Farnworth, P.G., Harrison, C., Nicholls, P., Wang, Y., Escalona, R.M., Fuller, P.J., Findlay, J.K., and Stenvers, K.L. (2009). Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 23, 539–548.

Bochenek, M.L., Dickinson, S., Astin, J.W., Adams, R.H., and Nobes, C.D. (2010). Ephrin-B2 regulates endothelial cell morphology and motility independently of Eph-receptor binding. *J. Cell Sci.* 123, 1235–1246.

Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., and Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* 23, 609–620.

Brown, M.A., Zhao, Q., Baker, K.A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., et al. (2005). Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 25111–25118.

Cai, J., Pardali, E., Sánchez-Duffhues, G., and ten Dijke, P. (2012). BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett.* 586, 1993–2002.

Canalis, E., Economides, A.N., and Gazzerro, E. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr. Rev.* 24, 218–235.

Cárcamo, J., Weis, F.M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J.L., Attisano, L., and Massagué, J. (1994). Type I receptors specify growth-inhibitory and

transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 3810–3821.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* *473*, 298–307.

Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., Luther, T., Gressens, P., Van Vlaenderen, I., Demunck, H., Kasper, M., Breier, G., Evrard, P., et al. (1996). Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* *383*, 73–75.

Castets, M., and Mehlen, P. (2010). Netrin-1 role in angiogenesis: to be or not to be a pro-angiogenic factor? *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 1466–1471.

Chen, B., and Lim, R.W. (1997). Physical and functional interactions between the transcriptional inhibitors Id3 and ITF-2b. Evidence toward a novel mechanism regulating muscle-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* *272*, 2459–2463.

Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M.D., Chien, K.R., et al. (2004). BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 2219–2231.

Compton, L.A., Potash, D.A., Brown, C.B., and Barnett, J.V. (2007). Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circ. Res.* *101*, 784–791.

Corti, P., Young, S., Chen, C.-Y., Patrick, M.J., Rochon, E.R., Pekkan, K., and Roman, B.L. (2011). Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 1573–1582.

Cunha, S.I., and Pietras, K. (2011). ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood* *117*, 6999–7006.

Cunha, S.I., Pardali, E., Thorikay, M., Anderberg, C., Hawinkels, L., Goumans, M.-J., Sehra, J., Heldin, C.-H., ten Dijke, P., and Pietras, K. (2010). Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *J. Exp. Med.* *207*, 85–100.

Darland, D.C., and D'Amore, P.A. (1999). Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J. Clin. Invest.* *103*, 157–158.

David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (Mar 1, 2007a). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* *109*, 1953–1961.

David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007a). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109, 1953–1961.

David, L., Mallet, C., Vailhé, B., Lamouille, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007b). Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J. Cell. Physiol.* 213, 484–489.

David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2008). Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.* 102, 914–922.

David, L., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 203–212.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584.

Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* 5, 410–421.

ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., Riddle, D.L., Ichijo, H., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1994). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.* 269, 16985–16988.

Dong, M., How, T., Kirkbride, K.C., Gordon, K.J., Lee, J.D., Hempel, N., Kelly, P., Moeller, B.J., Marks, J.R., and Blobe, G.C. (2007). The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 117, 206–217.

Dyer, L., Wu, Y., Moser, M., and Patterson, C. (2014). BMPER-induced BMP signaling promotes coronary artery remodeling. *Dev. Biol.* 386, 385–394.

Eble, J.A., and Niland, S. (2009). The extracellular matrix of blood vessels. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1385–1400.

Ehrlich, M. (2016). Endocytosis and trafficking of BMP receptors: Regulatory mechanisms for fine-tuning the signaling response in different cellular contexts. *Cytokine Growth Factor Rev.* 27, 35–42.

Eilken, H.M., and Adams, R.H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 617–625.

Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851–858.

Finger, E.C., Turley, R.S., Dong, M., How, T., Fields, T.A., and Blobe, G.C. (2008). TbetaRIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 29, 528–535.

Folkman, J., and D'Amore, P.A. (1996). Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87, 1153–1155.

Frank, D.B., Lowery, J., Anderson, L., Brink, M., Reese, J., and de Caestecker, M. (2008). Increased susceptibility to hypoxic pulmonary hypertension in Bmpr2 mutant mice is associated with endothelial dysfunction in the pulmonary vasculature. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L98–L109.

Frey, R.S., and Mulder, K.M. (1997). TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 117, 41–50.

Gale, N.W., Baluk, P., Pan, L., Kwan, M., Holash, J., DeChiara, T.M., McDonald, D.M., and Yancopoulos, G.D. (2001). Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev. Biol.* 230, 151–160.

García-Caballero, M., Blacher, S., Paupert, J., Quesada, A.R., Medina, M.A., and Noël, A. (2016). Novel application assigned to toluquinol: inhibition of lymphangiogenesis by interfering with VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway. *Br. J. Pharmacol.*

Gerety, S.S., Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1999). Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol. Cell* 4, 403–414.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177.

Gougos, A., and Letarte, M. (1988). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 141, 1925–1933.

Gougos, A., and Letarte, M. (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265, 8361–8364.

Goumans, M.-J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., and ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 21, 1743–1753.

Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S., and ten Dijke, P. (2003). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol. Cell* 12, 817–828.

Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., and Choe, S. (2003). The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol. Cell* 11, 605–617.

Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A., and Bernabeu, C. (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J. Biol. Chem.* 277, 29197–29209.

Hagihara, M., Endo, M., Hata, K., Higuchi, C., Takaoka, K., Yoshikawa, H., and Yamashita, T. (2011). Neogenin, a receptor for bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 5157–5165.

Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 27161–27167.

Harland, R.M. (1994). The transforming growth factor beta family and induction of the vertebrate mesoderm: bone morphogenetic proteins are ventral inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10243–10246.

Harrington, L.S., Sainson, R.C.A., Williams, C.K., Taylor, J.M., Shi, W., Li, J.-L., and Harris, A.L. (2008). Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc. Res.* 75, 144–154.

Hartsough, M.T., and Mulder, K.M. (1995). Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 7117–7124.

Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M.M., Wenzel, V., Boergermann, J.H., Hassel, S., Henis, Y.I., and Knaus, P. (2006). Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7791–7805.

Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Lagna, G., and Massagué, J. (1997). Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 388, 82–87.

He, W.W., Gustafson, M.L., Hirobe, S., and Donahoe, P.K. (1993). Developmental expression of four novel serine/threonine kinase receptors homologous to the activin/transforming growth factor-beta type II receptor family. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 196, 133–142.

Heinke, J., Wehofsits, L., Zhou, Q., Zoeller, C., Baar, K.-M., Helbing, T., Laib, A., Augustin, H., Bode, C., Patterson, C., et al. (2008). BMPER is an endothelial cell regulator and controls bone morphogenetic protein-4-dependent angiogenesis. *Circ. Res.* 103, 804–812.

Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J.J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., et al. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445, 776–780.

Helm, G.A., Alden, T.D., Beres, E.J., Hudson, S.B., Das, S., Engh, J.A., Pittman, D.D., Kerns, K.M., and Kallmes, D.F. (2000). Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent. *J. Neurosurg.* 92, 191–196.

Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* 88, 13–17.

Henis, Y.I., Moustakas, A., Lin, H.Y., and Lodish, H.F. (1994). The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers. *J. Cell Biol.* 126, 139–154.

Hérault, M., Schaffner, F., Pfaff, D., Prahst, C., Kirmse, R., Kutschera, S., Riedel, M., Ludwig, T., Vajkoczy, P., Graeser, R., et al. (2010). EphB4 promotes site-specific metastatic tumor cell dissemination by interacting with endothelial cell-expressed ephrinB2. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 1297–1309.

Herzog, Y., Guttmann-Raviv, N., and Neufeld, G. (2005). Segregation of arterial and venous markers in subpopulations of blood islands before vessel formation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 232, 1047–1055.

Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994–1998.

Hu-Lowe, D.D., Chen, E., Zhang, L., Watson, K.D., Mancuso, P., Lappin, P., Wickman, G., Chen, J.H., Wang, J., Jiang, X., et al. (2011). Targeting activin receptor-like kinase 1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis through a mechanism of action complementary to anti-VEGF therapies. *Cancer Res.* 71, 1362–1373.

Jen, Y., Manova, K., and Benezra, R. (1997). Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 208, 92–106.

Johnson, D.W., Berg, J.N., Baldwin, M.A., Gallione, C.J., Marondel, I., Yoon, S.J., Stenzel, T.T., Speer, M., Pericak-Vance, M.A., Diamond, A., et al. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat. Genet.* 13, 189–195.

Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 15, 1751.

Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 49–61.

Kendall, R.L., and Thomas, K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10705–10709.

Kim, J., Johnson, K., Chen, H.J., Carroll, S., and Laughon, A. (1997). *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* 388, 304–308.

Kim, J.-H., Peacock, M.R., George, S.C., and Hughes, C.C.W. (2012). BMP9 induces EphrinB2 expression in endothelial cells through an Alk1-BMPRII/ActRII-ID1/ID3-dependent pathway: implications for hereditary hemorrhagic telangiectasia type II. *Angiogenesis* 15, 497–509.

Kirkbride, K.C., Townsend, T.A., Bruinsma, M.W., Barnett, J.V., and Blobe, G.C. (2008). Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 7628–7637.

Knaus, P., and Sebald, W. (2001). Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol. Chem.* 382, 1189–1195.

Koch, A.W., Mathivet, T., Larrivée, B., Tong, R.K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvrée, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., et al. (2011). Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev. Cell* 20, 33–46.

Koenig, B.B., Cook, J.S., Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., Correa, P.E., Olson, C.A., Pecquet, A.L., Ventura, F., and Grant, R.A. (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5961–5974.

Lamouille, S., and Derynck, R. (2007). Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* 178, 437–451.

Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2002). Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100, 4495–4501.

Larrivée, B., Prahst, C., Gordon, E., del Toro, R., Mathivet, T., Duarte, A., Simons, M., and Eichmann, A. (2012). ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev. Cell* 22, 489–500.

Lastres, P., Bellon, T., Cabañas, C., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M., and Bernabeu, C. (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur. J. Immunol.* 22, 393–397.

Leblanc, E., Trens, F., Haroun, S., Drouin, G., Bergeron, E., Penton, C.M., Montanaro, F., Roux, S., Faucheux, N., and Grenier, G. (2011). BMP-9-induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 26, 1166–1177.

Lee, J., Gray, A., Yuan, J., Luoh, S.M., Avraham, H., and Wood, W.I. (1996). Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1988–1992.

Levet, S., Ouarné, M., Ciais, D., Coutton, C., Subileau, M., Mallet, C., Ricard, N., Bidart, M., Debillon, T., Faravelli, F., et al. (2015). BMP9 and BMP10 are necessary for proper closure of the ductus arteriosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E3207–E3215.

Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., and Vale, W. (2000). Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* *404*, 411–414.

Li, J.Z., Hankins, G.R., Kao, C., Li, H., Kammauff, J., and Helm, G.A. (2003a). Osteogenesis in rats induced by a novel recombinant helper-dependent bone morphogenetic protein-9 (BMP-9) adenovirus. *J. Gene Med.* *5*, 748–756.

Li, J.Z., Li, H., Dunford, B., Holman, D., Beres, B., Pittman, D.D., Hankins, G.R., and Helm, G.A. (2003b). Rat strain differences in the ectopic osteogenic potential of recombinant human BMP adenoviruses. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *8*, 822–829.

Li, J.Z., Li, H., Hankins, G.R., Dunford, B., and Helm, G.A. (2005). Local immunomodulation with CD4 and CD8 antibodies, but not cyclosporine A, improves osteogenesis induced by ADhBMP9 gene therapy. *Gene Ther.* *12*, 1235–1241.

Liu, F., Hata, A., Baker, J.C., Doody, J., Cárcamo, J., Harland, R.M., and Massagué, J. (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* *381*, 620–623.

López-Coviella, I., Berse, B., Krauss, R., Thies, R.S., and Blusztajn, J.K. (2000). Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science* *289*, 313–316.

Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* *10*, 839–850.

Macías-Silva, M., Hoodless, P.A., Tang, S.J., Buchwald, M., and Wrana, J.L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J. Biol. Chem.* *273*, 25628–25636.

Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M.G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 9267–9271.

Makanya, A.N., Hlushchuk, R., and Djonov, V.G. (2009). Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* 12, 113–123.

Massagué, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14, 627–644.

Mathews, L.S., and Vale, W.W. (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65, 973–982.

McDonald, D.M., and Baluk, P. (2005). Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest* 128, 602S – 608S.

Miller, A.F., Harvey, S.A., Thies, R.S., and Olson, M.S. (2000). Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J. Biol. Chem.* 275, 17937–17945.

Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 251–263.

Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem. (Tokyo)* 147, 35–51.

Mucsi, I., Skorecki, K.L., and Goldberg, H.J. (1996). Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 16567–16572.

Mulder, K.M. (2000). Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 23–35.

Mulder, K.M., and Morris, S.L. (1992). Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 5029–5031.

Nakano, N., Hori, H., Abe, M., Shibata, H., Arimura, T., Sasaoka, T., Sawabe, M., Chida, K., Arai, T., Nakahara, K., et al. (2007). Interaction of BMP10 with Tcap may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H3396–H3403.

Nelsen, S.M., and Christian, J.L. (2009). Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. *J. Biol. Chem.* 284, 27157–27166.

Neufeld, G., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 81–90.

Neuhaus, H., Rosen, V., and Thies, R.S. (1999). Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.* 80, 181–184.

Neuman, T., Keen, A., Zuber, M.X., Kristjansson, G.I., Gruss, P., and Nornes, H.O. (1993). Neuronal expression of regulatory helix-loop-helix factor Id2 gene in mouse. *Dev. Biol.* 160, 186–195.

Nicolas, R. (2013). ALK1 et BMP9 dans le remodelage vasculaire de la génétique humaine aux modèles murins.

Nyberg, P., Xie, L., and Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 65, 3967–3979.

O'Connell, P.J., McKenzie, A., Fisicaro, N., Rockman, S.P., Pearse, M.J., and d'Apice, A.J. (1992). Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 154–159.

Oh, S.P., Seki, T., Goss, K.A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P.K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., et al. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2626–2631.

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2576–2581.

Orlandini, M., Marconcini, L., Ferruzzi, R., and Oliviero, S. (1996). Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11675–11680.

Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H., and Miyazono, K. (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 193, 299–318.

Panchenko, M.P., Williams, M.C., Brody, J.S., and Yu, Q. (1996). Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am. J. Physiol.* 270, L547–L558.

Pardanaud, L., and Dieterlen-Lièvre, F. (1999). Manipulation of the angiopoietic/hemangiopoietic commitment in the avian embryo. *Dev. Camb. Engl.* 126, 617–627.

Park, S.O., Lee, Y.J., Seki, T., Hong, K.-H., Fliess, N., Jiang, Z., Park, A., Wu, X., Kaartinen, V., Roman, B.L., et al. (2008). ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood* 111, 633–642.

Park, S.O., Wankhede, M., Lee, Y.J., Choi, E.-J., Fliess, N., Choe, S.-W., Oh, S.-H., Walter, G., Raizada, M.K., Sorg, B.S., et al. (2009). Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Clin. Invest.* 119, 3487–3496.

Ploemacher, R.E., Engels, L.J., Mayer, A.E., Thies, S., and Neben, S. (1999). Bone morphogenetic protein 9 is a potent synergistic factor for murine hemopoietic progenitor cell generation and colony formation in serum-free cultures. *Leukemia* 13, 428–437.

Plouët, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D. (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 8, 3801–3806.

Reddi, A.H. (1992). Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 850–855.

Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 73–91.

Roelen, B.A., van Rooijen, M.A., and Mummery, C.L. (1997). Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 209, 418–430.

Roman, B.L., Pham, V.N., Lawson, N.D., Kulik, M., Childs, S., Lekven, A.C., Garrity, D.M., Moon, R.T., Fishman, M.C., Lechleider, R.J., et al. (2002). Disruption of *acvr1l* increases endothelial cell number in zebrafish cranial vessels. *Dev. Camb. Engl.* 129, 3009–3019.

Rudini, N., Felici, A., Giampietro, C., Lampugnani, M., Corada, M., Swirsding, K., Garrè, M., Liebner, S., Letarte, M., ten Dijke, P., et al. (2008). VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J.* 27, 993–1004.

Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2009). Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol. Rev.* 89, 607–648.

Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T., and Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 8949–8957.

Sanz-Rodriguez, F., Guerrero-Esteo, M., Botella, L.-M., Banville, D., Vary, C.P.H., and Bernabéu, C. (2004). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 32858–32868.

Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R.L., Zhao, Q., Pukac, L., Löwik, C.W.G.M., and ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J. Cell Sci.* 120, 964–972.

Seemann, P., Brehm, A., König, J., Reissner, C., Stricker, S., Kuss, P., Haupt, J., Renninger, S., Nickel, J., Sebald, W., et al. (2009). Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS Genet.* 5, e1000747.

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983–985.

Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Feder, J., and Dvorak, H.F. (1986). A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 46, 5629–5632.

Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J., and Pavletich, N.P. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94, 585–594.

Shin, D., Garcia-Cardena, G., Hayashi, S., Gerety, S., Asahara, T., Stavrakis, G., Isner, J., Folkman, J., Gimbrone, M.A., and Anderson, D.J. (2001). Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and

venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev. Biol.* 230, 139–150.

Shovlin, C.L. (2010). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev.* 24, 203–219.

Song, J.J., Celeste, A.J., Kong, F.M., Jirtle, R.L., Rosen, V., and Thies, R.S. (1995). Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology* 136, 4293–4297.

Stenvers, K.L., Tursky, M.L., Harder, K.W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R.A., Sizeland, A.M., and Zhu, H.-J. (2003). Heart and Liver Defects and Reduced Transforming Growth Factor β 2 Sensitivity in Transforming Growth Factor β Type III Receptor-Deficient Embryos. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4371–4385.

Suttapreyasri, S., Koontongkaew, S., Phongdara, A., and Leggat, U. (2006). Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 35, 444–452.

Suzuki, Y., Ohga, N., Morishita, Y., Hida, K., Miyazono, K., and Watabe, T. (2010). BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 123, 1684–1692.

Taipale, J., Makinen, T., Arighi, E., Kukk, E., Karkkainen, M., and Alitalo, K. (1999). Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 237, 85–96.

Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D., and Böhlen, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1579–1586.

del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., et al. (2010a). Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116, 4025–4033.

del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., et al. (2010b). Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116, 4025–4033.

Townson, S.A., Martinez-Hackert, E., Greppi, C., Lowden, P., Sako, D., Liu, J., Ucran, J.A., Liharska, K., Underwood, K.W., Seehra, J., et al. (2012). Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J. Biol. Chem.* 287, 27313–27325.

Upton, P.D., Davies, R.J., Trembath, R.C., and Morrell, N.W. (2009). Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 284, 15794–15804.

Urness, L.D., Sorensen, L.K., and Li, D.Y. (2000). Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat. Genet.* 26, 328–331.

Valdimarsdottir, G., Goumans, M.-J., Rosendahl, A., Brugman, M., Itoh, S., Lebrin, F., Sideras, P., and ten Dijke, P. (2002). Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106, 2263–2270.

Venkatraman (2008). *Progress in Polymer Science*.

de Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L.T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989–991.

Wallin, R., Cain, D., Hutson, S.M., Sane, D.C., and Loeser, R. (2000). Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb. Haemost.* 84, 1039–1044.

Walsh, D.W., Godson, C., Brazil, D.P., and Martin, F. (2010). Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol.* 20, 244–256.

Wan, M., and Cao, X. (2005). BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 651–657.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5510–5514.

Wang, X.L., Zhao, J., Qin, L., and Qiao, M. (2016). Promoting inflammatory lymphangiogenesis by vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) aggravated intestinal inflammation in mice with experimental acute colitis. *Braz. J.*

Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica A1 49, e4738.

Wilkes, M.C., Mitchell, H., Penheiter, S.G., Doré, J.J., Suzuki, K., Edens, M., Sharma, D.K., Pagano, R.E., and Leof, E.B. (2005). Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res.* 65, 10431–10440.

Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., and Wang, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528–1534.

Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.F., and Massagué, J. (1992). TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003–1014.

Wrana, J.L., Tran, H., Attisano, L., Arora, K., Childs, S.R., Massagué, J., and O'Connor, M.B. (1994a). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol. Cell. Biol.* 14, 944–950.

Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. (1994b). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341–347.

Ye, L., Kynaston, H., and Jiang, W.G. (2009). Bone morphogenetic protein-10 suppresses the growth and aggressiveness of prostate cancer cells through a Smad independent pathway. *J. Urol.* 181, 2749–2759.

Zimmerman, L.B., De Jesús-Escobar, J.M., and Harland, R.M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599–606.